



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

PATOLOGIA Y CLINICA MEDICAS

EL MÉTODO INMUNOPEROXIDÁSICO EN EL DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO DE LOS SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS.

AUTOR: Ricardo Jesús Bernal Ruiz

DIRECTOR: Antonio Aznar Reig

15 de Junio de 1981

R. 5.046



T.D.
B/27



EL METODO IMMUNOPEROXIDASICO EN EL DIAGNOSTICO
CITOLOGICO DE LOS SINDROMES LINFOPROLIFERATIVOS



HOSPITAL UNIVERSITARIO
DE LA
FACULTAD DE MEDICINA

AVDA. DR. FEDRIANI S/N
SEVILLA

D. ANTONIO AZNAR REIG, CATEDRATICO NUMERARIO
DE PATOLOGIA Y CLINICA MEDICAS, DE LA FACUL-
TAD DE MEDICINA DE SEVILLA,

CERTIFICA: Que D. RICARDO JESUS BERNAL RUIZ, bajo mi di-
rección y la de los doctores D. CLAUDIO MON-
TERO LINARES, Jefe de la Sección de Histoquí-
mica del Servicio de Anatomía Patológica y
D. GONZALO DIAZ DE YRAOLA, Jefe del Servicio
de Hematología y Hemoterapia de la Ciudad Sa-
nitaria Virgen del Rocio de Sevilla, ha rea-
licado el siguiente Trabajo denominado:

"EL METODO INMUNOPEROXIDASICO EN EL DIAGNOS-
TICO CITOLOGICO DE LOS SINDROMES LINFOPROLI-
FERATIVOS".

que presenta como Tesis Doctoral.

Sevilla, 15 de Junio de 1.981.

o. Prof. A. AZNAR REIG.

DR. C. MONTERO LINARES.

DR. G. DIAZ DE YRAOLA

Claudio Montero

G. J. Diaz de Yraola



DEDICATORIA

A Mary Carmen

A mis padres

AGRADECIMIENTO

Al Profesor Dr. D. Antonio Aznar Reig, catedrático de Patología y Clínica Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, director de esta Tesis, como reconocimiento a su eficaz orientación en su organización y desarrollo.

Al Dr. D. Claudio Montero Linares, Jefe de la Sección de Histoquímica del Servicio de Anatomía Patológica, co-director de esta Tesis Doctoral, cuyos consejos y preocupación constantes han sido noble guía en mi quehacer diario, cuyo fruto es el presente trabajo y mi propia formación.

Al Dr. D. Gonzalo Díaz de Yraola, Jefe del Servicio de Hematología y Hemoterapia de la Ciudad Sanitaria "Virgen del Rocío" de Sevilla, co-director de esta Tesis Doctoral, que en igual manera ha contribuido a la realización del presente trabajo.

A él, mi mayor agradecimiento, por cuanto sus sabios consejos han contribuido decididamente en mi período de formación y especialización.

Al Dr. D. Antonio Martin Noya, Médico Adjunto del mismo Servicio de Hematología y Hemoterapia, por sus valiosos consejos y su apoyo permanente.

A todos los componentes del Servicio de Hematología y Hemoterapia de la Ciudad Sanitaria "Virgen del Rocío", entre los cuales he desarrollado mi labor y mi aprendizaje.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
- El sistema linfoide y su concepción actual.....	4
- Estructura y función de las inmunoglobulinas.....	22
- Los síndromes linfoproliferativos.....	26
- Métodos de estudio citológico.....	34
- Los métodos inmunocitoquímicos.....	37
- Los métodos inmunoperoxidásicos.....	41
MATERIAL Y METODO.....	57
RESULTADOS.....	70
DISCUSION.....	94
CONCLUSIONES.....	128
BIBLIOGRAFIA.....	136

ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpo.

Ag: Antígeno.

C': Sistema complemento.

CIg: Inmunoglobulina intracistoplásmica.

DAB: Diaminobencidina.

F_{ab}: Fragmento de una inmunoglobulina por medio del cual reacciona con el antígeno.

F_c: Fragmento cristizable de una inmunoglobulina.

FB: Factor blastogénico producido por los linfocitos T.

GM: Gammapatía monoclonal.

Ig: Inmunoglobulina.

LCL: Leucemia de células linfoesarcomatosas.

LLA: Leucemia linfoblástica aguda.

LLC: Leucemia linfocítica crónica.

LMC: Leucemia mieloide crónica.

MAF: Factor activador de los macrófagos producido en los linfocitos T.

MIF: Factor inmovilizador de los macrófagos producido en los linfocitos T.

PAP: Complejo soluble de peroxidasa-antiperoxidasa.

PR: Peroxidasa del rábano.

RICH: Reacción injerto-contrainjerto.

RIH: Respuesta inmune humoral.

SIg: Inmunoglobulina de superficie.

TdT: Desoxinucleotidil transferasa terminal.

RESUMEN

Los métodos llamados immunoperoxidásicos han supuesto un notable avance en los campos de la inmunohistoquímica y de la inmunocitoquímica, aventajando a la inmunofluorescencia en sensibilidad y en la posibilidad de visualizar los rasgos morfológicos de las células.

Entre los métodos immunoperoxidásicos destaca, por su gran sensibilidad y elevada especificidad, el método del PAP ó de Sternberger, desarrollado por este autor al principio de la década de los setenta. En los últimos años, este método se ha intentado adaptar a extensiones celulares hematológicas con resultados hasta la fecha irregulares.

En esta Tesis, el motivo de la proposición ha sido llevar a cabo una adaptación del método mencionado en extensiones hematológicas secadas al aire, para demostrar el contenido celular de inmunoglobulinas. El estudio experimental se ha realizado en treinta y tres pacientes diagnosticados de diversos síndromes linfoproliferativos malignos (leucemia linfoide crónica, leucemia de células linfosarcomatosas, leucemia linfoblástica aguda, síndrome de Sézary, mieló

ma, macroglobulinemia de Waldeström y linfomas) y benignos (plasmocitosis reactiva), y en dos donantes de sangre sanos.

En el presente estudio se han evaluado los efectos de la fijación sobre la antigenicidad de las inmunoglobulinas y sobre la morfología celular, ensayandose un total de nueve fijadores.

Destaca la conservación de la antigenicidad de los anticuerpos lograda con el formaldehido-calcio de Baker, demostrada especialmente en siete enfermos con leucemia linfoide crónica, y que supera claramente los resultados de la inmunofluorescencia directa.

Asímismo se han valorado tres métodos diferentes para inhibir la actividad peroxidásica endógena de la preparación, sesenta variantes dilucionales de antisueros, cinco métodos de contratinción y pruebas cronológicas adicionales.

Los aspectos técnicos y conceptuales son discutidos.

INTRODUCCION

"El lector, al llegar al final de este artículo puede tener la sensación de que se trata de conceptos más bien fragmentarios, con múltiples datos que, a pesar de su importancia individual, sólo tienen una oscura relación recíproca. En realidad, ellos reflejan precisamente el estado actual de nuestro conocimiento en lo que concierne a las superficies de las células inmunocompetentes. De un modo conceptual y quizá también físico, estas superficies constituyen un verdadero rompecabezas, donde faltan muchas piezas; las que tenemos, hasta ahora comienzan a adoptar sus formas características y, aunque resultan muy interesantes, estamos lejos de saber como ordenar con precisión todo el conjunto."

J. W. Uhr (1.979)

El conocimiento de la biología celular y de sus manifestaciones en el organismo humano obliga continuamente a los investigadores a buscar nuevos caminos a las ciencias aplicadas al diagnóstico. Por otra parte, la medicina hospitalaria moderna necesita constantemente y cada vez más de nuevos métodos de análisis asequibles a la práctica de rutina.

Por ello, nos planteamos como tema de esta Tesis la adaptación en extensiones hematológicas de una relativamente reciente técnica inmunohis

toquímica de gran especificidad y elevada sensibilidad: el método inmunoperoxidásico del PAP, también denominado "método de Sternberger".

Como premisas necesarias, exponemos en esta Introducción los dos aspectos que, a nuestro juicio, tienen mayor interés para una mejor comprensión del tema elegido: por un lado la concepción que actualmente se tiene del Sistema Linfoide y, de otra parte, los medios técnicos que permiten establecer e interpretar el comportamiento inmunológico celular, es decir los métodos inmunocitoquímicos, subrayando, entre estos, la importancia de los métodos inmunoperoxidásicos.

EL SISTEMA LINFOIDE Y SU CONCEPCION ACTUAL

El sistema linfoide es una unidad orgánico-funcional, perfectamente integrada, cuya actividad principal conocida es la defensa inmunológica del organismo. Nuevas facetas son sacadas continuamente a la luz por los investigadores. Pese a ello, numerosas funciones de este sistema permanecen desconocidas ó no bien explicadas.

Como indica Vives-Puiggros (137), órgano y función son dos conceptos que siempre van ligados, pero la descripción anatómica de un órgano no nos informa implícitamente sobre su función. Un ejemplo muy claro de esta disociación entre órgano y función lo tenemos en el sistema linfoide. La descripción anatómica de los ganglios linfáticos, el bazo, el timo, la médula ósea,... data de varios siglos. Sin embargo^{no} es hasta la década de 1950 cuando se define al linfocito como la célula central del sistema inmunitario. A partir de este descubrimiento se abre una puerta a nuevos problemas sobre la fisiología de este complejo sistema.

El linfocito se configura actualmente como la célula central de la inmunidad. Es el encargado de la "respuesta inmune" tras la toma de contacto con el antígeno. Dicha respuesta cubre dos vertientes:

1ª La inmunidad "humoral", constituida por la síntesis y secreción de determinadas glicoproteínas denominadas inmunoglobulinas (Ig).

2ª La inmunidad "celular", no ligada estrictamente a la secreción de anticuerpos humorales, y que radica en una clase de linfocitos especialmente sensibilizados, a los cuales compete las reacciones de hipersensibilidad retardada.

Uno de los hechos más característicos del sistema inmunitario es la naturaleza específica de las reacciones antígeno-antiicuerpo. Esta propiedad acontece en los linfocitos, adquiriendo cada uno de ellos una "memoria" con las distintas especificidades que configuran la capacidad inmunológica de un individuo.

De esta manera, un suero inmune puede discernir entre dos proteínas que se diferencien tan sólo en un aminoácido, entre dos compuestos químicos que difieran en un grupo funcional, entre las formas dextrógira y levógira de un aminoácido, y entre otros muchos compuestos íntimamente relacionados. Así, la actividad inmunológica del sistema linfoide puede esquematizarse en las proposiciones siguientes (105):

a) Los anticuerpos son específicos respecto al antígeno utilizado para obtener la respuesta inmune, y tal especificidad tiene su base en la secuencia de aminoácidos y en la estructura tridimensional de la molécula del anticuerpo.

b) Los anticuerpos pueden reaccionar con antígenos estructuralmente relacionados con el antígeno específico utilizado para obtener la respuesta inmune. Cuando esto ocurre, la unión tiene lugar por medio de energías de interacción que son usualmente inferiores para el antígeno relacionado que para el principal.

c) La respuesta inmune humoral es generalmente heterogénea. Un sólo determinante antigénico puede originar una respuesta constituida por inmunoglobulinas diferentes. Y a su vez, individualmente las inmunoglobulinas pueden mostrar afinidad por una amplia gama de determinantes antigénicos simples.

Colaborando con el sistema linfoide actúa el denominado Sistema Mononuclear Fagocítico, integrado por la serie monocitaria (incluidos los histiocitos), los granulocitos sanguíneos y las células cebadas. Su misión corresponde a la defensa celular más temprana. Además, es competencia del monocito-macrófago facilitar la elaboración del antígeno, así como la síntesis y liberación de sustancias que modifican las manifestaciones de la respuesta inmunitaria (83).

Anatomía del Sistema Linfoide

La evolución del sistema linfoide conduce a la formación de dos poblaciones celulares inmunocompetentes, diferentes morfológica y funcionalmente. Dicho sistema, desde un punto de vista anatómico-funcional, comprende tres compartimentos:

- 1) El fondo común de células madres.
- 2) Los órganos linfoides centrales.
- 3) Los órganos linfoides periféricos.

El fondo común de células madres ó germinales (tam

bien denominadas células tronco ó "stem cells") está constituido por elementos primitivos, no especializados, con capacidad para una amplia replicación, autorenovación y diferenciación hacia formas más maduras. Son el origen de las diferentes series celulares hematológicas. Según parece tienen su origen durante la embriogénesis a partir de las células hemoangioblásticas del saco embrionario. Posteriormente, en el transcurso de la vida fetal su fuente principal de producción es el hígado. Trás el nacimiento residen fundamentalmente en la médula ósea.

Establecida esta premisa, el resto del sistema linfóide se distribuye de la forma siguiente:

- a) Organos linfoides centrales: - Médula ósea.
 - Timo.
- b) Organos linfoides periféricos: - Ganglios.
 - Bazo.
 - Otros.

Los órganos linfoides centrales son el origen primario de los linfocitos: a partir de las células germinales surgen los linfocitos inmunocompetentes. Así, de la médula ósea se originarían los llamados linfocitos B, que tienen a su cargo la inmunidad humoral, y del timo los linfocitos T, rectores de la inmunidad y directamente responsables de la inmunidad celular.

A continuación presentamos una somera revisión de los órganos linfoides primarios:

Timo:

Este órgano constituye en los vertebrados el origen primario de las células linfoides de tipo T. De constitución linfo-epitelial, las células germinales linfoides se le unen en la segunda mitad de la embriogénesis,

diferenciando^{se} con posterioridad de forma irreversible hacia linfocitos T (37, 83, 117). En el ser humano, el timo aumenta gradualmente de tamaño hasta la adolescencia, a partir de la cual comienza a involucionar, quedando reducido en el adulto a un rudimento con un importante componente de fibrosis. Ello explica porqué la extirpación del órgano en estas edades no produce alteraciones en la inmunidad del individuo, o si las produce son mínimas. En cambio, la timectomía postnatal origina un grave deterioro de la respuesta inmune.

Médula ósea:

Su misión como órgano linfoide primario no es bien conocida. En la médula ósea de un individuo normal se suele observar la presencia de escasos folículos linfoides que aumentan en cantidad conforme el adulto llega a la vejez. Se supone que debe existir una relación entre los mismos y la producción de los linfocitos B, aunque este hecho no se ha podido objetivar aún.

Así pues, la médula ósea sería el equivalente bursal en el hombre (la bolsa de Fabricio, en las aves, constituye el órgano primario de los linfocitos B). Sin embargo otros investigadores consideran que el equivalente bursal radica en el hígado fetal, primer lugar en el que se ha observado la formación de linfocitos B, o bien que su origen es múltiple, incluyendo las placas de Peyer intestinales, el apéndice y el saculum rotundum (83).

De otra parte, los órganos linfoides secundarios o periféricos son asiento de la respuesta inmune, al ser el lugar donde los linfocitos, tras recibir el estímulo antigénico, realizan la proliferación clonal y la diferenciación hacia la célula plasmática (caso de los linfocitos B) y hacia el linfocito "destructor" (caso de

los linfocitos T) (Figura 1).

Bazo:

es un órgano vascular, cuya actividad inmunológica se desarrolla fundamentalmente en la llamada "pulpa blanca", zona en la que se disponen las arteriolas centrales rodeada de linfocitos timodependientes (vaina linfocitaria periarteriolar ó VLPA), perifericamente a los cuales se observan islotes de linfocitos B correspondientes a folículos linfoides con o sin centro germinativo. Una zona marginal ocupada en forma dispersa por linfocitos circunda vaina y folículos; contiene además numerosas células reticulares con ramificaciones, al parecer adaptadas a la captación del antígeno.

El resto del órgano está constituido por la denominada "pulpa roja" en la que aparecen células plasmáticas cuando un estímulo antigénico afecta a la VLPA y a los centros de los folículos. (37, 83).

Ganglios linfáticos:

la arquitectura normal del ganglio linfático permite distinguir en él tres zonas más o menos bien delimitadas:

a) Zona Cortical: se encuentra inmediatamente bajo el seno subcapsular. En ella se observan agrupaciones redondeadas de linfocitos: son los folículos primarios, integrados por células B. Algunos folículos muestran una coloración más clara: son los llamados folículos secundarios, cuyo centro claro se debe a la activación blástica originada por un estímulo antigénico, denominándose "centro germinativo".

b) Zona Paracortical: está ocupada por linfocitos timodependientes procedentes de la sangre periférica, que llegan al ganglio a través de las vénulas postcapilares.

c) Zona medular: se extiende bajo la paracortical.

La zona medular está ocupada por células plasmáticas, macrófagos y elementos linfoides.

Los capilares linfáticos convergen hacia el ganglio y, a través de la cápsula, desembocan al seno capsular, desde donde la linfa fluye radialmente hacia los senos medulares, saliendo finalmente a través del vaso linfático eferente a nivel del hilio.

La circulación sanguínea se distribuye de modo siguiente: la arteria hiliar se abre en un abanico vascular hacia la zona del cortex donde los capilares abocan a las venas postcapilares, a través de cuyas paredes los linfocitos emigran hacia el intersticio.

Otros órganos linfoides secundarios:

Entre estos hay que destacar fundamentalmente dos: el tejido linfoide asociado al intestino (TLAI) y el tejido linfoide broncopulmonar.

El TLAI se inicia a nivel de la bucofaringe con el anillo de Waldeyer, y se extiende por esófago, estómago e intestinos delgado y grueso. Se dispone en forma de folículos dispersos por la lámina propia y la submucosa. En ciertos lugares como las placas de Peyer o los ganglios linfáticos densos del apéndice confluyen numerosos folículos.

Los folículos linfoides de las placas de Peyes contienen linfocitos T y B, aunque en estos últimos no ha podido ser demostrada la síntesis in vivo de anticuerpos, quizá por la carencia que tienen de elementos del sistema monocito-macrófago.

De otra parte el tejido linfoide broncopulmonar está integrado por acúmulos de linfocitos, similares a folículos, que se distribuyen por la lámina propia y submucosa de bronquios y bronquiolos.

Caracterización funcional de los linfocitos: las poblaciones B y T.-

La población de células linfoides está constituida por elementos que muestran características peculiares, morfológicas y funcionales, que pueden ser demostradas a través del estudio de sus marcadores de superficie, de cultivos celulares y, por supuesto, a nivel de microscopías óptica y electrónica.

Hemos de señalar que a lo largo de esta Tesis, emplearemos el término de "células Linfoides" en referencia a elementos de esta población cualquiera que sea su estadio madurativo, incluyendo a la célula plasmática como representante del grado de mayor diferenciación.

Y hecha esta indicación, a manera de inciso, continuamos desarrollando el tema expresando que, en principio, las células linfoides integran dos poblaciones de distinta inmunocompetencia:

a) Población T: de origen tímico, tiene a su cargo la inmunidad celular. En la Fig. 1 se muestran algunas de las actividades conocidas de estas células.

b) Población B: está formada por células procedentes del equivalente bursal humano y su principal función conocida es la inmunidad humoral, caracterizada por la síntesis de las inmunoglobulinas o anticuerpos.

Las células T:

Los linfocitos T son las células centrales de la inmunidad. Actualmente se sabe que a su vez presentan varias subpoblaciones funcionalmente diferentes, y esta división laboral no corres-

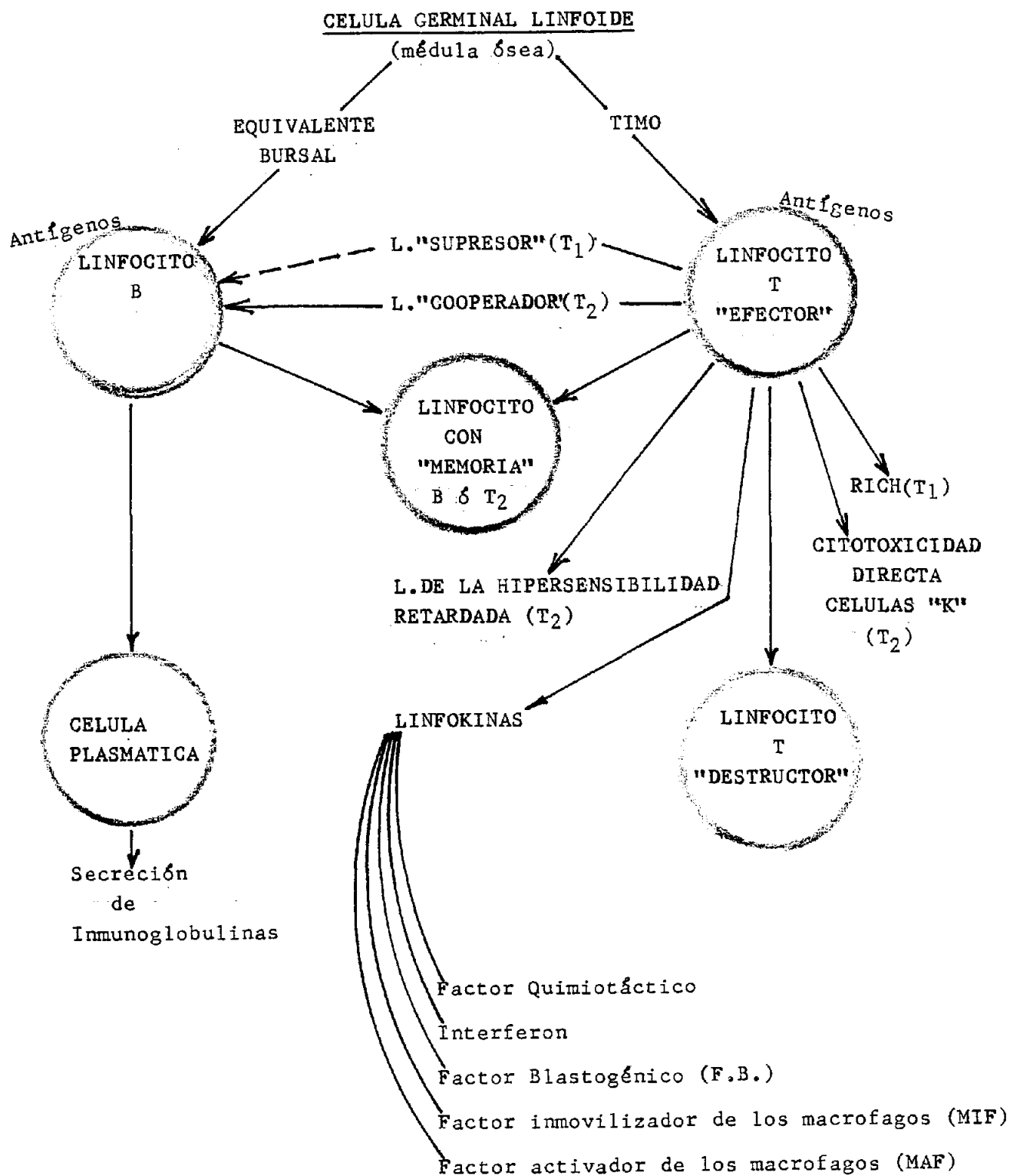


FIGURA 1

de a diferentes grados de maduración de una sola línea celular, sino a una heterogeneidad de origen.(37).

Los estudios más recientes indican la existencia de dos subpoblaciones T:

- 1a) La supoblación T_1 , cuyos linfocitos se caracterizan por:
- a) Vida corta. Constituyen el 20 por 100 del total.
 - b) No suelen encontrarse circulantes en la sangre periférica.
 - c) Suelen residir en el timo y en el bazo.
 - d) Son iniciadores de la reacción injeto-contrahuesped (RICH).
 - e) Actividad "supresora" sobre la respuesta inmunológica de los linfocitos B y, probablemente sobre otras poblaciones de células T.

2a) La subpoblación T_2 , que se considera que tiene las siguientes competencias:

- a) Vida larga (algunos autores hablan hasta de diez años).
- b) Suelen hallarse circulando en la sangre periférica ó en la región paracortical (timo-dependiente) de los ganglios linfáticos.
- c) Son potenciadores de la RICH.
- d) Cooperan (linfocitos T "helper") con los linfocitos B en la denominada "respuesta inmune humoral compleja".
- e) Tienen actividad citotóxica directa (linfo-

citots T "killer") e indirecta por medio de la síntesis y secreción de mediadores biológicos ("linfokinas") contra estructuras biológicas extrañas al propio organismo (gérmenes, injertos tisulares).

f) A diferencia de los linfocitos T_1 , los T_2 persisten tras la timectomía en el adulto.

Las células B:

Los linfocitos B son los mediadores de la respuesta humoral, siendo su principal actividad conocida la síntesis y secreción de los anticuerpos (Ac) como reacción biológica específica ante la presencia de un antígeno (Ag).

Los anticuerpos ó inmunoglobulinas (Ig) son los mediadores de la respuesta inmune; orgánicamente son glucoproteínas con variabilidad isotípica (de clase, subclase, tipo y subtipo), alotípica (de pendiente de genes o alelos diferentes en un locus individual) e idiotípica (función que radica en los determinantes antigénicos del lugar de unión al Ag)(107).

Los Ag son aquellas sustancias (proteicas, glicídicas, lipídicas ó mixtas) capaces de inducir una respuesta inmunitaria y de reaccionar con los efectores humorales de dicha respuesta. La forma en que entran en "relación" con los linfocitos B a sido explicada de diversas maneras. En la actualidad se aceptan como posibles dos vías de interacción:

- 1.- Respuesta B pura, no ligada a la intervención de los linfocitos T.

2.- Cooperación T-B en presencia del macrófago.

En la respuesta B-dependiente, las células B reconocen a los antígenos a través de sus inmunoglobulinas de superficie, SIg, verificandose la unión Ag-SIg a la cual sucede de manera inmediata un estímulo celular. La consecuencia de éste es la transformación del linfocito B en una célula secretora de Ig: la célula plasmática, y por otra parte l-a génesis simultánea de un linfocito B con "memoria inmunológica específica".

En la cooperación T-B de la respuesta inmune humoral en presencia de un macrófago, el mecanismo es más complejo y no bien conocido en su totalidad. Según esta teoría los antígenos serían elaborados por el macrófago tras su captación, y a continuación el linfocito T interaccionaría con el macrófago "recogiendo" el antígeno elaborado para a su vez pasarselo al linfocito B y originar así la transformación del mismo.

En efecto, los macrófagos poseen en su superficie receptores para los linfocitos T y B, por medio de los cuales ponen a estas células en contacto con los Ag previamente fagocitados. Y así, en una primera fase los linfocitos T no activados se unirían de manera reversible a los macrófagos metabólicamente activos; esta unión sería rápida y tendría lugar en presencia de calcio iónico. En una segunda fase dicha unión se tornaría irreversible, estando asociada a la presencia del antígeno; durante la misma los linfocitos T serían metabólicamente activos, y se prolongaría durante 20-24 horas. Finalizado este período, tendría lugar la cooperación T-B, y la transformación del linfocito B en una célula secretora de Ig.

En este complejo mecanismo, la segunda etapa re-

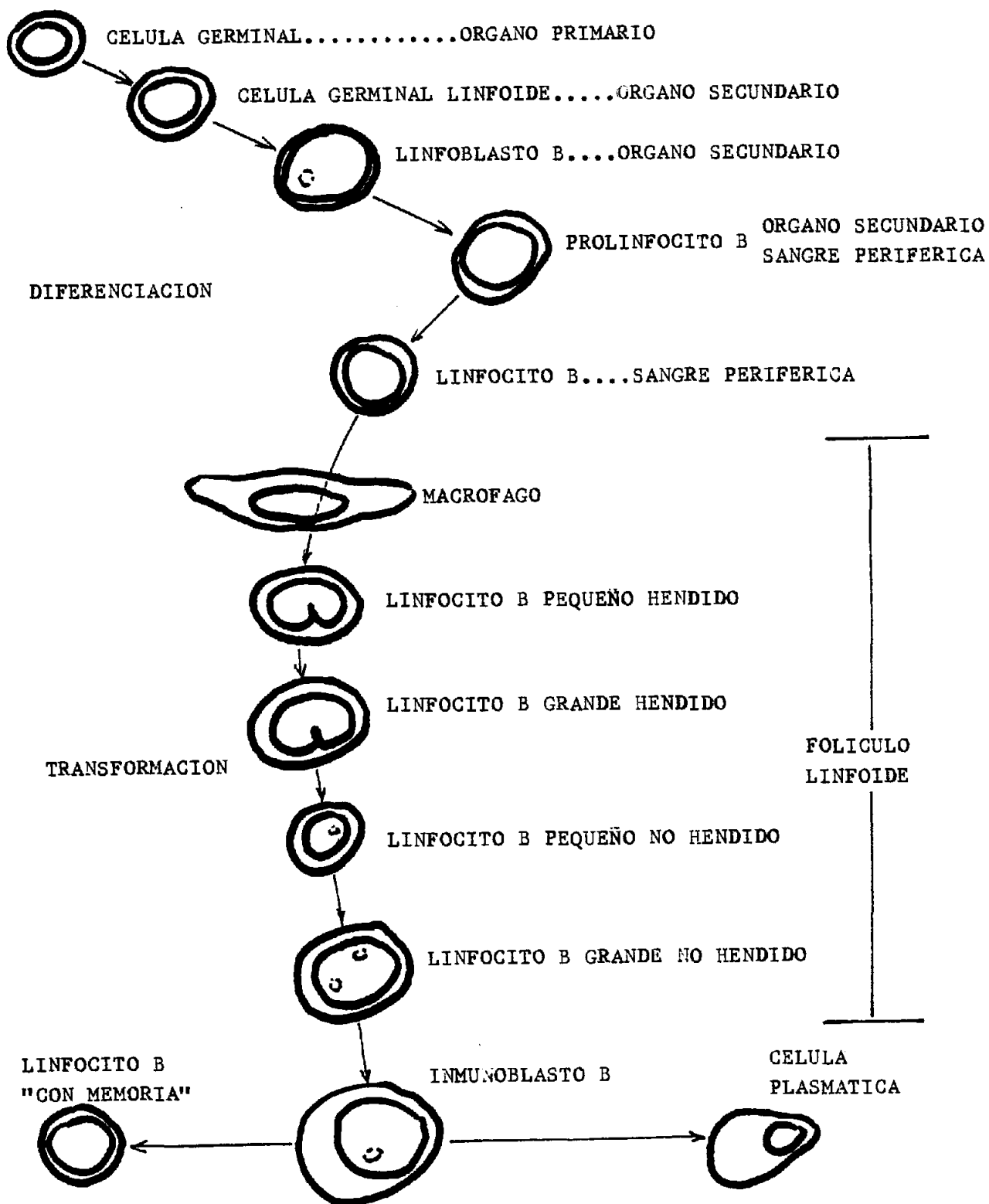


FIGURA 2

quiere que la células que se interrelacionan sean idénticas en el complejo mayor de histocompatibilidad.

La transformación linfocítica es un complejo fenómeno que tiene lugar a nivel de los folículos linfoideos. Los linfocitos B llegan al folículo a través de dos vías: el torrente sanguíneo y los linfáticos aferentes. Su destino es el área folicular donde van a ser estimulados por el Ag. En la Figura 2 están reflejados los pasos morfológicos y migratorios del linfocito B a través de su diferenciación normal en los órganos centrales y periféricos, y en la sangre periférica, y de su transformación a nivel del folículo tras la estimulación antigénica, con la creación final de la célula plasmática. (modificado) (68).

En la respuesta humoral inmune, los folículos primarios sufren una transformación que da lugar a la constitución de los centros germinativos, que en los cortes histológicos se diferencian como centros claros. Igualmente, las áreas paracorticales (timodependientes) se transforman en centros reactivos.

Los linfocitos B realizan la transformación siempre en la región centrofolicular (68, 69).

La llamada por Lukes y Collins (1974)(69) "dendritic reticular cell" es una célula del sistema mononuclear fagocítico, es decir un macrófago, que tiene la peculiaridad de ser una célula madura funcionalmente, pero que conserva su capacidad mitótica ante un estímulo adecuado (Fig. 2). Es una célula muy activa, con numerosas mitocondrias y haces fibrilares intracitoplásmicos, a pesar de que no se ha demostrado en ella actividad fibrilopoyética; es rica en hidrolasas ácidas. En su membrana se demuestran receptores para la fracción cristalizable (Fc) de las Ig citoflicas, que parecen estar relacionados con la fagocitosis

immune y la pinocitosis. Posee, asimismo, receptores para el complemento en su membrana. Como indicamos anteriormente, se desconoce la intimidad del mecanismo de la interacción que realizan con los linfocitos en la respuesta humoral immune compleja.

Sin embargo, cualquiera que sea el mecanismo con que tiene lugar el estímulo, el resultado final es la constitución de la denominada célula plasmática, elemento linfoide con capacidad de síntesis y de secreción de Ig que se corresponde con su amplio citoplasma y el abundante retículo endoplásmico rugoso que posee.

La célula plasmática sintetiza las Ig en el retículo endoplásmico y en el Golgi. En el primero forma las cadenas polipeptídicas que constituirán la base estructural del Ac, y en el segundo le adiciona los radicales glicídicos que terminan de caracterizarlo. No obstante, ya en el retículo endoplásmico se demuestra la antigenicidad propia de las Ig, hecho que podría estar relacionado con una síntesis temprana de la porción Fc en la que residen normalmente los caracteres antigénicos propios de cada Ig.

Las células plasmáticas se localizan en los órganos linfoides primarios y secundarios, y muy raramente en la sangre periférica. La secreción de Ig la realizan mediante vesículas desprendidas del aparato de Golgi que se adosan a la membrana celular, abriendo se finalmente al exterior y liberando su contenido. Pruebas experimentales con aminoácidos marcados con tritio han demostrado que efectivamente las Ig se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso (fracción proteica), de donde pasan al aparato de Golgi, lugar en el que adquieren la porción hidrocarbonada como indicamos anteriormente. Pero se puede considerar que desde que se encuentran en el interior de los sá-

culos y vesículas del Gogi, están fuerade la célula, pues no están en contacto con el citoplasma (131). La ruptura de las vesículas al espacio extracelular es sinónimo de secreción, desprendiéndose, ocasionalmente, trozos de las vesículas unidos a Ig.

Sin embargo, en la ontogenia del linfocito B, la presencia de Ig en el citoplasma (CIg) o en la superficie celular (SIg) no es constante, existiendo variaciones dependientes del grado de maduración de la célula. Así, la primera célula linfoide en que se detecta Ig^{es} el linfoblasto B, siendo CIgM la primera en demostrarse (102). A continuación, y desde el propio estadio de linfoblasto sólo se demuestra SIg hasta la etapa madurativa del cambio de linfocito hendido a no hendido, en la que ya se demuestra nuevamente CIg (55). Casi simultaneamente a la aparición de CIg en los linfocitos centrofoliculares, comienza a disminuir gradualmente la cantidad de SIg hasta desaparecer prácticamente en la célula plasmática, donde es máxima la tasa de CIg (125).

En los linfocitos de la sangre periférica, el parámetro que se considera actualmente como de más valor para confirmar el origen B es la demostración de SIg. Sin embargo, esta valoración se realiza teniendo en cuenta que en la superficie de la célula existen dos clases de SIg:

a) SIg Intrínseca: es sintetizada por la propia célula portadora, como se demuestra al tripsinizar las células e incubarlas a corto plazo para realizar nuevamente la clase y tipo de SIg.

b) SIg extrínseca: se demuestra porque no aparece tras el procedimiento antes indicado. Esta SIg está absorbida sobre la superficie celular fundamentalmente por medio de receptores de Fc (17).

Por tales razones la demostración de SIg se realiza

previo tratamiento de los linfocitos para desprender las SIg extrínsecas de carácter citofílico, sea por tripsinización, por incubación a 37°C (66), por incubación en medio ácido, etc.

La función que representan las SIg no es bien conocida, sin embargo se cree que juegan un importante papel en la respuesta inmune. En la ontogenia del linfocito la primera que se demuestra es la SIgM y posteriormente SIgD (135). Esta última se encuentra en el suero a concentraciones muy bajas, mostrando una actividad de Ac muy baja y sin que se detecte en ella ninguna actividad biológica. No obstante se demuestra en la mayoría de los linfocitos B del adulto. Su aparición en el curso del desarrollo ontogénico no está asociada a estímulos antígenicos, no depende del timo y desaparece de la membrana celular tras la estimulación antigénica. Por tal motivo se piensa que la SIgD actúa como "señal positiva" de la iniciación de la tolerancia inmunológica (84). Además, y según las investigaciones de Uhr (137), podría pensarse que los linfocitos B poseen SIgM muy tempranamente, y que adquieren la SIgD durante el proceso de diferenciación en el bazo, suponiéndose que después emigran al tejido linfoide periférico como pequeños linfocitos con suficiente competencia inmunológica para "responder" al Ag. Dada la escasa cantidad de la SIgD en los linfocitos, se estima que actúa principalmente como receptor, en contraste con las demás clases de Ig, y que facilita el proceso del estímulo antigénico.

El estudio de otros marcadores tales como receptores de Fc, y receptores para el complemento (C), no alcanza la especificidad de las SIg intrínsecas, ya que se demuestran en otras células tales como monocitos y granulocitos neutrófilos. Así, se ha demostrado la presencia de receptores para Fc, a nivel ultraestructural, mediante

el empleo de complejos solubles de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) en células de la sangre periférica: en el 9 por 100 de los linfocitos normales, en el 25% de los monocitos, en el 100 por 100 de los neutrófilos y en el 0 por 100 de los eosinófilos (51).

Por otra parte, los linfocitos B de la sangre periférica no forman rosetas espontáneas con los hematíes de carnero, ni se afectan con los sueros antitimocitos, pruebas que son positivas en los linfocitos T.

Los linfocitos no T, no B:

Entre los linfocitos que pueblan la sangre periférica existe una tercera población que no muestra SIg y es negativa a los test de rosetas espontáneas con hematíes de carnero, y que algunos han denominado linfocitos "nulos" (21, 141).

Sin embargo, en la actualidad esta concepción queda en entredicho, pues se demuestra que existen linfocitos T que no reaccionan con los hematíes de carnero y que por lo tanto no forman rosetas espontáneas, pero que sin embargo son afectados por el suero antitimocitario. Este hecho ha sido demostrado en los estudios inmunológicos de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (43), y se piensa que posiblemente sea una realidad relativamente frecuente.

De otra parte, la puesta en práctica de nuevos marcadores disminuye constantemente el porcentaje de esta población, por lo que su "existencia" posiblemente sea fruto de la limitación de las propias técnicas inmunológicas utilizadas.

ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Las inmunoglobulinas (Ig) ó gammaglobulinas constituyen la fracción proteica del suero que migra con mayor lentitud durante la electroforesis, aunque ocasionalmente están presentes en las fracciones beta y alfa-2.

Son cuerpos químicos cuya actividad biológica tiene lugar en el contexto de la respuesta inmune humoral, donde asumen el papel de Ac. Sintetizadas en las células B, se encuentran libremente en el plasma, en los tejidos y en las glándulas de secreción exocrina.

Estructuralmente, las Ig están constituidas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas y dos ligeras, unidas entre sí por puentes disulfuros, y además una fracción hidrocarbonada.

Diversas variaciones en la estructura de las Ig dan lugar a la existencia de una serie de clases, tipos y subtipos que frecuentemente condicionan su comportamiento biológico y que complican su nomenclatura. Actualmente se conocen las variantes siguientes:

a) Clases: se conocen cinco, y su variabilidad depende de diferencias observadas en la constitución de las cadenas pesadas, presentado además cualidades individuales en cuanto a su funcionamiento, a la causa antigénica que determina su síntesis, a la capacidad de polimerizarse, etc. Hasta la fecha se conocen las clases IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, que corresponden respectivamente a las cadenas pesadas gamma, alfa, mu, delta y épsilon.

b) Subclases: son originadas por variaciones cuantitativas y cualitativas de los puentes disulfuros que unen entre sí a

ESQUEMA DE LA MOLECULA DE UNA INMUNOGLOBULINA

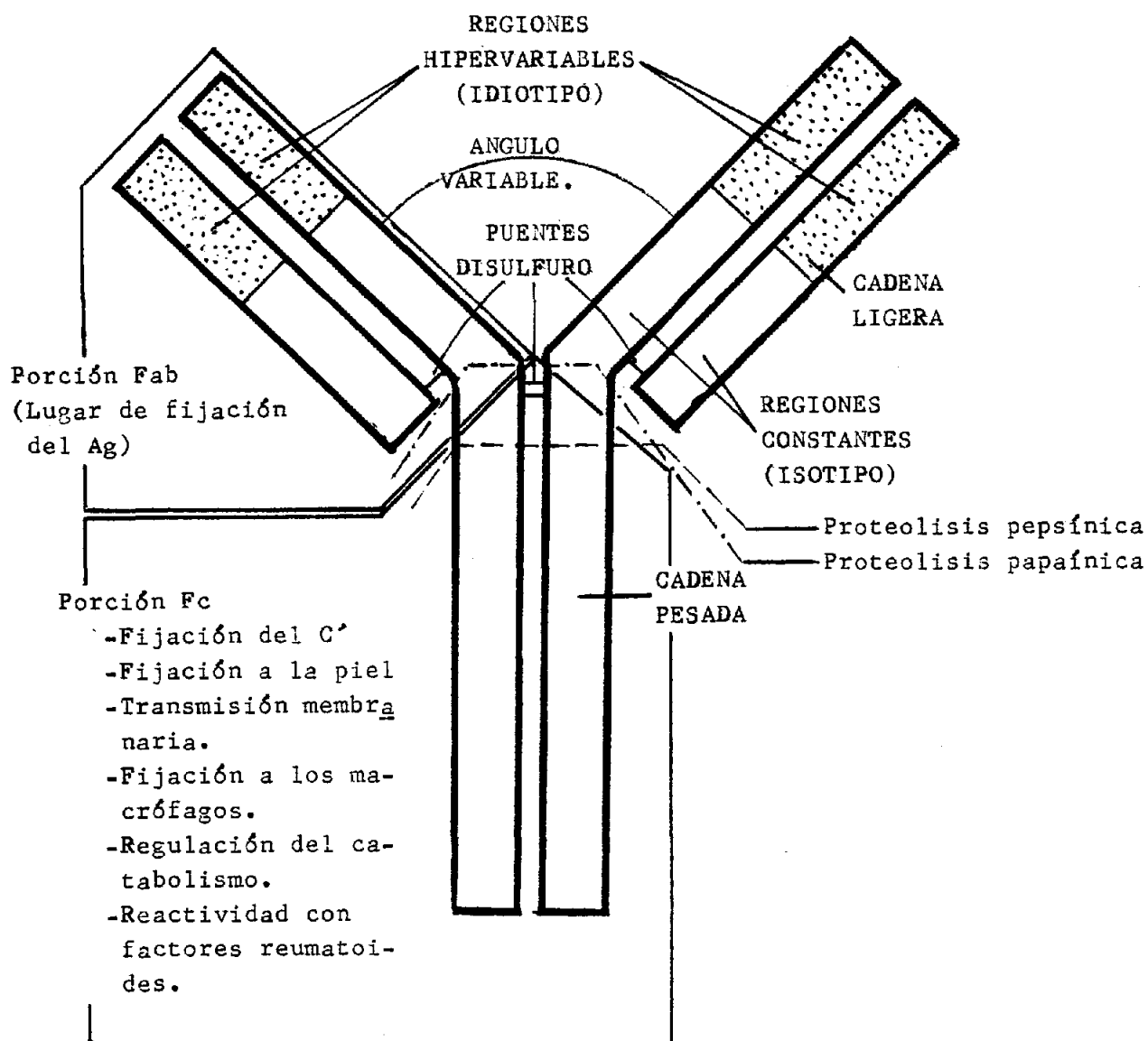


FIGURA 3

las cadenas pesadas, y a éstas con las ligeras, diferencias en su vida media, en su estado de polimerización y en su localización en los tejidos y secreciones (52). Actualmente se reconocen cuatro subclases de IgG (gamma 1-4), dos de IgA (alfa 1 y alfa 2), dos de IgM (mu 1 y mu 2), dos de IgD (delta 1 y delta 2) y en IgE no se han demostrado.(107).

c) Tipos: los tipos antigénicos hacen referencia a la cadena ligera presente. Se conocen dos: kappa y lambda, comunes a todas las clases y subclases de Ig.

d) Subtipos: están condicionados por variaciones en la porción constante de las cadenas ligeras, es decir variaciones isotípicas, conociéndose cuatro en las cadenas lambda: O_z^+ , O_z^- , $kern^+$ y $kern^-$.

e) Subgrupos: son originados por variaciones en las porciones inconstantes de las cadenas pesadas y ligeras (variaciones idiotípicas). En las primeras se conocen tan sólo tres, en tanto que en las ligeras se han reconocido tres subgrupos de kappa (V_{kI} , V_{kII} , V_{kIII}) y cinco de lambda (V_{lI} - V_{lV}).

En toda Ig pueden identificarse varias subunidades estructurales mediante disociación enzimática. La acción proteolítica de la papaina sobre la molécula de Ig da lugar a la formación de tres fragmentos, de los que dos son idénticos y en ellos residen los lugares de unión al Ag (fracción Fab: "fragment antigen binding"), y un tercero en el que radican las cualidades antigénicas de la Ig y que es cristizable (fracción Fc). En cambio, cuando se emplea pepsina tan sólo se forman dos fragmentos: uno la porción Fc y el otro integrado por las dos porciones Fab unidas por puentes disulfuro ($F(ab)_2$), conservando este último su actividad de Ac y, por tanto, pudiendo precipitar con el Ag, aun

que no posee las cualidades antigénicas propias de la Ig.

Diversos estudios han puesto de relieve la existencia de estructuras globulares compactas, unidas entre sí por cortas regiones abiertas de cadena polipeptídica, a los que se denomina "dominios". En las cadenas pesadas existen cuatro dominios, excepto en las de IgM e IgE en las que existe uno más. Cada dominio tiene aproximadamente 110 aminoácidos, y un puente disulfuro que da lugar a su peculiar forma globular. Estos dominios poseen actividades biológicas diversas, entre las que destacan (52, 107):

- 1) Asociación adicional entre las cadenas pesadas y ligeras.
- 2) Fijación del complemento y regulación de las funciones catabólicas.
- 3) Propiedades citofílicas.
- 4) Fijación a la piel.
- 5) Fijación a los macrófagos.
- 6) Transmisión membranaria.
- 7) Reactividad con factores reumatoideos.
- 8) Unión de la pieza "J" entre los monómeros de IgA y de IgM.

La pieza "J" (joining = unión) es una cadena polipeptídica que tiene aproximadamente 130 aminoácidos, y que actúa como enlace entre los monómeros de las Ig poliméricas (IgA e IgM). No obstante, no se ha logrado demostrar su presencia en los linfocitos pre-B o B-primitivos, y en cambio se ha demostrado su síntesis intracelular simultáneamente a la de Ig de diversas clases (poliméricas y monoméricas), por lo que se han considerado su posible participación en el montaje intracelu-

celular de los componentes de las cadenas de las distintas Ig (82). Entre los linfocitos de la sangre periférica, la cadena J está prácticamente ausente en la membrana (11), en tanto que ~~en tanto que~~ aparece en la mayoría de los escasos linfocitos B que poseen Glg de las distintas clases (12).

SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS

Los conocimientos actuales sobre la biopatología del linfocito han determinado una profunda revisión, aún en curso, del concepto de los denominados "síndromes linfoproliferativos". Los estudios clínicos, citológicos, a nivel óptico y ultraestructural, e inmunológicos, proporcionan nuevos enfoques en la investigación de estos síndromes.

Los síndromes linfoproliferativos de carácter benigno se caracterizan por su reversibilidad tras la desaparición de la noxa desencadenante. Las estirpes proliferantes, en estos casos, corresponden por lo general a varias clonas linfocitarias. En su mayoría suelen ser secundarios a procesos virales ó bacterianos, o bien surgen en el curso de otros procesos patológicos en forma de reacciones plasmocíticas.

Sin embargo, el término de "síndromes linfoproliferativos" suele reservarse para aquellos cuadros de carácter maligno originados por una proliferación linfoide neoplásica. En estos casos, el grado de afectación de la sangre periférica y de la médula ósea y otros tejidos viene a ser un índice fiable del estadio evolutivo de la enfermedad, que se caracteriza por su monclonalidad y su curso irrever-

sible.

La clasificación de los síndromes linfoproliferativos plantea el problema del propio origen de las células tumorales. En la actualidad no existe ninguna clasificación que sea universalmente aceptada. Nuevos elementos se añaden a los ~~elásticos~~ parámetros clásicos; tendiéndose a valorar tres aspectos: morfológico, citoquímico e inmunocitoquímico.

Con un criterio simplista y practico, podriamos clasificar los síndromes linfoproliferativos malignos en tres grupos:

1º.- Con expresión leucémica inicial:

a) Leucemia linfoblastica aguda (LLA):

- De origen T
- De origen B
- No T, no B

b) Leucemia linfoide crónica (LLC):

- De origen T
- De origen B

En ella se incluirían la prolinfocítica, la linfosarcomatosa crónica y la linfoplasmocitoide.

c) Tricoleucemia.

d) Síndrome de Sèzary

2º.- Sin expresión leucémica inicial:

a) Linfoma de Hodgkin

b) Linfomas no Hodgkin.

3º.- Con disgammaglobulinemia:

a) Plasmocitoma-Mieloma

b) Enfermedades de las cadenas pesadas

c) Enfermedad de Waldeström

d) Sarcoma immunoblástico

En las Figuras 4 y 5 expresamos esquematicamente la diferenciación del linfocito B y T, respectivamente, con la correlación aproximada de las derivaciones linfoproliferativas malignas que se estiman en la actualidad (modificado de Espinos y cols, 1977, 38), considerando como válido el esquema aprotado por Lukes y Collins (68), y valorando exclusivamente la expresión leucémica de aquellas.

Por otra parte, y por el interés en la valoración de los resultados de esta Tesis, exponemos algunos aspectos, brevemente, referidos a los conceptos actuales inmunológicos de las enfermedades siguientes:

- Leucemia linfoide crónica(LLC)
- Leucemia linfoblástica aguda(LLA)
- Leucemia de células linfosarcomatosas(LCL)
- Mieloma múltiple

Leucemia linfoide crónica.-

Actualmente se considera a la LLC como una proliferación monoclonal de elementos linfoides de origen B, morfológicamente maduros y de aspecto bien diferenciado, que raramente implica una proliferación de células T.

La LLC-B se caracteriza por una tasa baja de SIg en los linfocitos neoplásicos con respecto a los normales. Este hecho ha sido cuantificado (33), estimandose una media de 12.800 lugares de SIg en el estudio de los linfocitos neoplásicos de la sangre periférica, con respecto a 48.000 de media en sujetos normales y sanos.

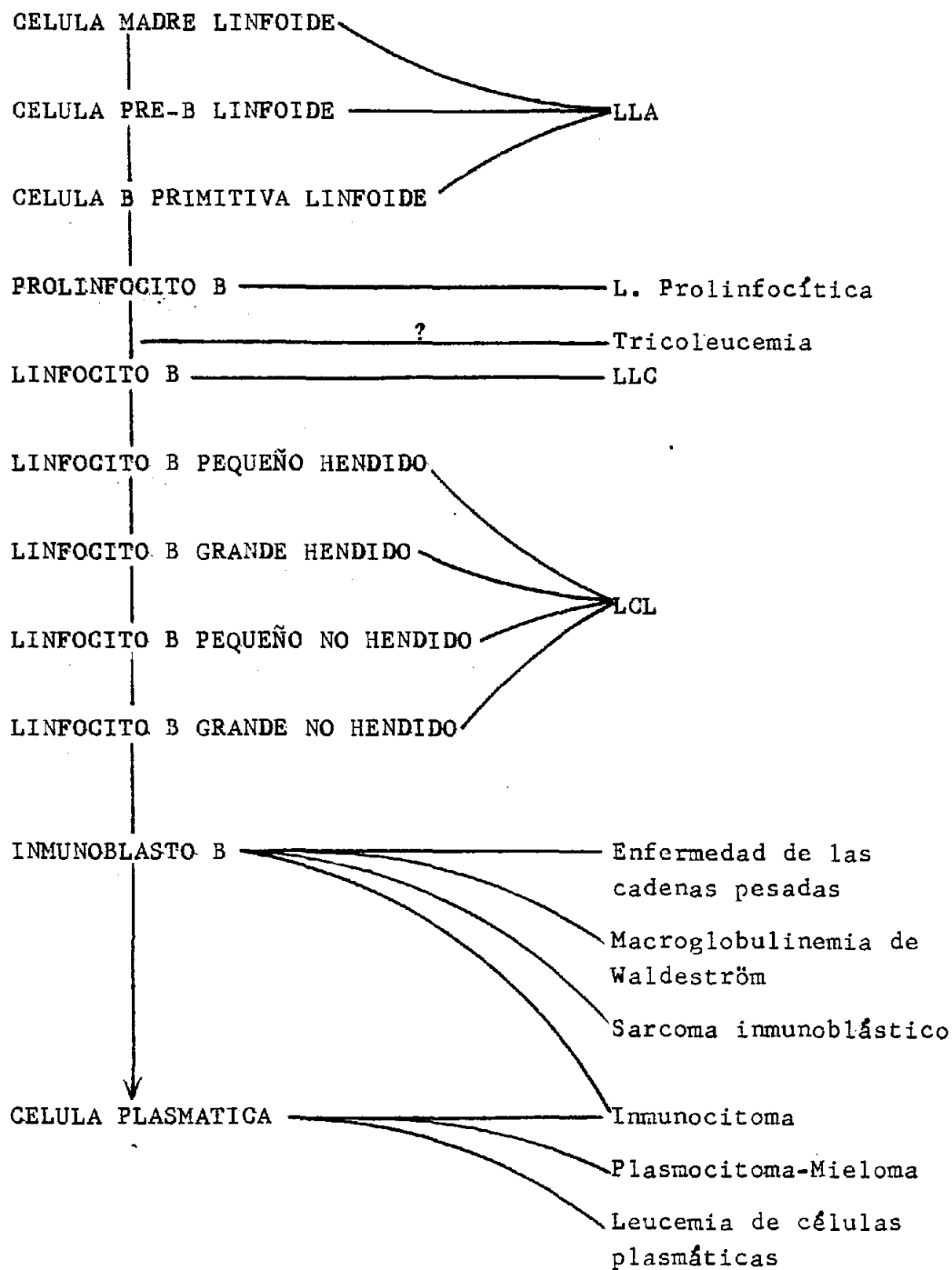


FIGURA 4

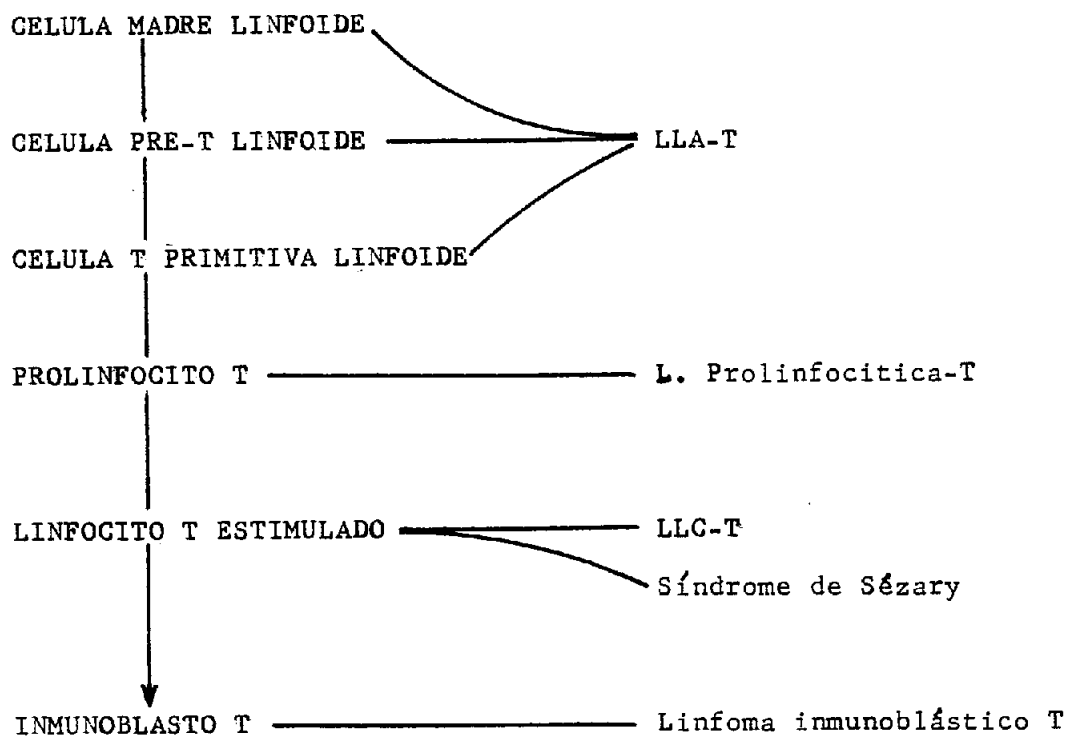


FIGURA 5

La escasa cuantía de SIg intrínsecas en los linfocitos de la sangre periférica de la LLC-B, supone un importante inconveniente a la hora de demostrarlas por las técnicas inmunocitoquímicas convencionales. Por otra parte, cuando estas se aplican a material fijado, hay que considerar los efectos de la fijación química sobre los radicales bioquímicos de las cadenas inmunoglobulínicas que caracterizan a su antigenicidad.

Los problemas de la fijación se obvian hasta cierto punto trabajando sobre suspensiones celulares, como es habitual en la inmunofluorescencia de rutina. Sin embargo la disponibilidad de este material bien conservado durante días es difícil, y de ello el interés de trabajar sobre material fijado que se puede almacenar el tiempo necesario para completar, y comprobar si fuese necesario, el estudio sin merma importante de la antigenicidad de las Ig.

Con respecto a la clonalidad de la enfermedad, se la considera como una linfoproliferación monoclonal, aunque se conocen casos en los que se han demostrado dos clones simultáneamente (100).

Leucemia de células linfosarcomatosas (LCL).-

La LCL corresponde a la manifestación hemoperiférica de los síndromes linfoproliferativos que integran los denominados linfomas centrofoliculares (68) ó centrocíticos y/o centroblásticos (112), siendo por tanto de estirpe B.

En la mayoría de los casos la LCL crónica está constituida por linfocitos hendidos, siendo menos frecuente la proliferación de linfocitos no hendidos. Así pues, generalmente presentan plegaduras nucleares, no siendo rara la presencia de formas "riederiformes".

En cuanto a los aspectos inmunológicos de estas células, no se tienen datos concluyentes sobre la presencia de CIg y sí, en cambio, de SIg con un patrón monoclonal. No obstante, aceptando que estas células corresponden a la leucemización de linfomas centrofoliculares, y considerando que un destacado porcentaje de estos presentan CIg en sus elementos sin que por ello tengan que ser calificados de inmunocitomas (55), es probable que las células linfosarcomatosas también puedan poseer CIg monoclonal, sin que ello signifique un estadio inmunoblástico B.

Leucemia linfoblástica aguda (LLA).-

La LLA es una enfermedad heterogénea. Los estudios de marcadores de membrana han permitido definir tres variantes de origen en esta enfermedad: LLA-T, LLA-B y LLA no T, no B.

En la actualidad se estima que las LLA no T, no B constituyen el 70-80 por 100 de estos desórdenes (14), las LLA-T el 20-39 por 100 y las LLA-B el 1-3 por 100 (43).

Recientemente, Foon y cols. (1980)(43) han propuesto una nueva clasificación inmunológica de las LLA distinguiendo doce subgrupos, basándose en el estudio de SIg, rosetas espontáneas con hematíes de carnero, receptores del C', receptores de Fc, antígeno Ia-like, antígenos timocitarios y antígenos "asociados" a la LLA no T, no B. Quizá uno de los aspectos más interesantes de esta compleja (y hasta cierto punto confusa) clasificación, es la existencia de LLA-T cuyos linfoblastos son negativos para los test de rosetas espontáneo, en tanto que reaccionan con el suero antitimocitario (observación hecha en 5 pacientes de una revisión de 70 casos de LLA), hecho que cuestiona una vez más el concepto del origen no T, no B.

Mieloma múltiple.-

La célula mielomatosa es un linfocito B neoplásico, cuya proliferación sucede en el estadio más diferenciado de la transformación linfocítica.

Desde el punto de vista inmunológico, la enfermedad suele cursar con un aumento de la tasa sérica de una determinada inmunoglobulina que es sintetizada en grandes cantidades por los plasmocitos neoplásicos, cuyo número se encuentra habitualmente elevado por encima del 15 por 100 en la celularidad del aspirado de médula ósea.

Queremos destacar el hecho de que la síntesis inmunoglobulínica está alterada en la célula mielomatosa, de tal manera que frecuentemente la tasa de cadenas ligeras segregadas es superior a la de las pesadas correspondientes. En efecto, en condiciones normales las cadenas ligeras y pesadas son sintetizadas en diferentes ribosomas. Pues bien, se ha podido demostrar que las células de al menos un 75 por 100 de los pacientes con mielomas IgG sintetizan más cadenas ligeras que pesadas (146), hecho que parece ser aún más frecuente en los mielomas IgA. Además, no se debe olvidar el hecho de que más del 20 por 100 de los mielomas sólo producen cadenas ligeras.

Por otra parte, siendo el mieloma múltiple un síndrome linfoproliferativo maligno de carácter sistémico, habría que esperar una correlación inmunológica entre el estudio de los plasmocitos tumorales y los linfocitos de la sangre periférica, sin embargo, recientemente Nicholls y cols. (1981) (88) en un estudio sobre 24 pacientes con mieloma múltiple encuentran correlación en cinco, en tanto que los diecinueve restantes diferencian en la cadena pesada o/y en la ligera.

METODOS DE ESTUDIO CITOLOGICO

El estudio de la citología hematológica se realiza habitualmente sobre finas extensiones, a las que son aplicables varios procedimientos de análisis instrumental, destacando:

- la fijación
- las coloraciones citológicas
- las coloraciones citoquímicas
- y los métodos inmunocitoquímicos.

La fijación.-

Es el procedimiento por el cual se conserva la morfología celular y se preservan las estructuras bioquímicas, introduciendo el menor artefacto posible. La composición química se conserva en función del fijador utilizado; por lo que la elección de éste irá condicionada por los principios orgánicos que interesa demostrar. Así, para la demostración de enzimas, la acetona es un buen fijador porque prácticamente no las desnaturaliza.

La generalidad de los fijadores actúa sobre las proteínas celulares, originando uniones de gran estabilidad entre las moléculas proteicas, como es el caso de las uniones metileno que constituye el formaldehído al reaccionar con los grupos amino, carboxilo e indol de aquellas.

El fijador ideal es aquel que hace precipitar la proteína en la forma más fina, como es el caso del metanol, con lo que la morfología celular queda optimamente conservada, hecho por lo demás de enorme interés en la citología hematológica.

Las coloraciones citológicas.-

La mayoría de los colorantes citológicos son de naturaleza orgánica y aromática. En todos ellos existen grupos químicos de terminantes del color, de naturaleza ácida ó básica, que tienen apetencia por radicales básicos y ácidos, respectivamente de las proteínas.

En toda proteína las variaciones de pH del medio ocasionan una ionización que, en función de aquel, determinarán una ionización ácida (principalmente por medio de los grupos carboxilo, $-\text{COOH}$, e hidroxilo, $-\text{OH}$) ó básica (por los grupos amino, $-\text{NH}_2$) que determinará su afinidad por colorantes básicos (como el eosinato de azul de metileno por ejemplo) o ácidos (como la eosina) respectivamente.

Así, si elevamos el pH del medio por encima del punto isoelectrico de la proteína los grupos ácidos se ionizan, tanto más cuanto mayor es la elevación del pH; a mayor número de grupos ácidos ionizados mayor intensidad de coloración con los colorantes básicos. La inversión del pH ocasiona el mismo fenómeno con los colorantes ácidos.

Aspectos citoquímicos de los linfocitos normales y patológicos.-

Las técnicas citoquímicas aportan datos de gran valor en el estudio de los linfocitos, suministrando una valiosa información sobre el origen B ó T de estas células. De ahí que estos estudios hayan entrado a formar parte de los métodos de rutina de la moderna Hematología clínica a nivel de la microscopía óptica, y abriéndose camino gradualmente en la microscopía electrónica.

En general, en la citología hematológica tiene interés la demostración de cuatro grupos de sustancias (142):

a) Carbohidratos: se ponen de manifiesto mediante

la reacción del ácido peryódico de Schiff ó reacción del PAS.

b) Enzimas oxidantes: se demuestran mediante la denominada reacción de peroxidasas, empleandose como sustrato cromogénico la bencidina, la diaminobencidina ó el 4-cloro-1-naftol. También pueden ser puestas de relieve mediante la reacción de los lípidos de Sheehan y Stirey.

c) Enzimas hidrolíticas: fosfatasas alcalinas y ácidas, betaglucuronidasa, muramidasa (lisozima) y esterases.

d) Componentes inorgánicos: el más destacado es el hierro, que se demuestra con la clásica reacción de Perls.

En el 10-20 por 100 de los linfocitos hemoperiféricos normales existen gránulos de material PAS positivo, siendo constantemente negativos a las peroxidasas, fosfatasa alcalina y lisozima; en cambio un notable porcentaje es positivo a las hidrolasas ácidas y a las esterases inespecíficas.

Catovsky (18, 19) considera a las hidrolasas ácidas como un marcador citoquímico de los linfocitos de origen T, en los que aparecerían con un patrón granular -generalmente único- en posición centrosómica, a nivel del aparato de Golgi. Sin embargo, también los linfocitos B muestran una ~~debil~~ ^{debil} positividad difusa a la fosfatasa ácida y a la beta-glucuronidasa, si bien en ellos dichas enzimas se localizan en las pequeñas partículas lisosomales dispersas por el citoplasma.

Además de las hidrolasas ácidas, también se han empleado como marcadores propios de las células T la alfa-naftil-acetoesterasa-ácida y la alfa-naftil-butiratoesterasa, destacándose el hecho de que esta última frecuentemente se demuestra en los linfocitos calificados de no T, no B (142).

En la patología del linfocito maligno, la generali-

dad de los criterios antes expresados se mantiene, quizá con la peculiaridad de que, al ser una clona celular la que uniformemente prolifera, los resultados citoquímicos también son similares en la mayoría de las células. No obstante, a veces existen particularidades propias a ciertas enfermedades, como es la tartrato resistencia en la tinción de la fosfatasa ácida, frecuentemente asociada a la tricoleucemia.

LOS METODOS INMUNOCITOQUIMICOS

Los métodos inmunocitoquímicos se basan en el aprovechamiento de la antigenicidad de las sustancias celulares. La mayoría de tales métodos se caracteriza por el empleo de Ac marcados con distintos cromógenos. Usualmente, se suelen emplear como marcadores la ferritina (en microscopía electrónica), fluorocromos (como la fluoresceína y la rodamina) y enzimas (peroxidasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida).

La ferritina es una macromolécula de 35 Å de diámetro y peso molecular de 650.000 daltons, con un contenido de hierro del 23 por 100. Tiene especial utilidad en estudios de ultraestructura, siendo fácilmente identificable gracias a las cuatro condensaciones que posee. Las moléculas de ferritina se unen a sus anticuerpos portadores mediante sustancias químicas que actúan como puentes ó "ligandos bifuncionales", verificándose la unión a nivel de la porción Fc de la Ig, con la finalidad de dejar libres los fragmentos Fab. Sin embargo, este procedimiento tiene algunos inconvenientes, tales como la existencia de Ac en el suero que no son los deseados y que pueden unirse a moléculas de ferritina sobrenadantes, originando reacciones inespecíficas; otras veces las moléculas de ferritina se unen a la Ig por los fragmentos Fab limitando ó impidiendo la unión con el Ag; finalmente otra de las desventajas de es

te método es el gran tamaño del complejo Ig-ferritina, que dificulta su tránsito a través de las membranas celulares (114).

De otra parte están los llamados métodos de inmunofluorescencia, basados en el empleo de Ac marcados con sustancias fluorescentes a la luz ultravioleta (UV) y ampliamente desarrollados en las dos últimas décadas, y que nos han proporcionado la inmensa mayoría de los conocimientos actuales sobre los antígenos celulares y tisulares, especialmente las Ig.

La percepción al microscopio óptico de objetos fluorescentes supone la necesidad de una radiación de excitación (luz UV) que actuase sobre un fluorocromo, que a su vez emitiría una radiación excitada o de fluorescencia, de mayor longitud de onda y por tanto dentro de la gama visible del espectro luminoso (24, 25).

En las técnicas de inmunofluorescencia el fluorocromo va unido al Ac por medio de un "ligando bifuncional". El marcador más comunmente utilizado es el isotiocianato de fluoresceína, que conjugado con la Ig constituye un inmunocomplejo. Su aplicación técnica presenta las siguientes variantes:

a) Prueba directa: se incuba la muestra que contiene el Ag en la solución de inmunocomplejos.

b) Prueba indirecta: consta de dos etapas. En la primera se incuba el material en una solución de una Ig específica contra el Ag que se desea demostrar; esta Ig procede de un animal de la especie (A). En una segunda etapa se realiza una nueva incubación, esta vez en una solución de Ac anti-A conjugado con un fluorocromo.

c) Prueba de doble tinción: se utilizan simultáneamente dos anticuerpos de especificidad diferente, marcados con distintos fluorocromos, con la finalidad de demostrar dos Ag.

d) Técnica secuencial: se realiza en primer lugar la determinación de un Ag y se recoge fotográficamente el resultado. Se seguidamente se deja pasar el tiempo necesario para que ~~des~~parezca la actividad del fluorocromo, y se repite el proceso para otro Ag. Se fotografía el mismo campo, y se comparan las imágenes obtenidas.

e) Aplicación del isotiocianato de fluoresceína conjugado con la proteína A del estafilococo aúreo en la prueba indirecta, aprovechando la afinidad de dicha proteína por la porción Fc delas Ig. (114).

f) Técnica de sandwich: se utiliza para demostrar el contenido de Ig de una cierta especificidad en una muestra de material. Para ello se incuba en primer lugar con el Ag propio de la Ig que deseamos demostrar; a continuación se fija la muestra y se procede a incubarla en una solución de Ac-fluorocromo con especificidad hacia el mismo antígeno.

Sin embargo, la interpretación no siempre es fácil en los métodos de inmunofluorescencia. En primer lugar, la gran sensibilidad del procedimiento asociada al hecho de que pone en evidencia todos los sistemas Ag-Ac, sean precipitantes o no, aglutinantes o no, fijadores o no, da lugar a numerosas reacciones cruzadas, hecho que limita su empleo en el diagnóstico.

Si se tiñen linfocitos B viables (en suspensión) a bajas temperaturas (4°C) con un suero anti-Ig conjugado con fluorocromo, este se observará en forma parcheada en la superficie celular. Sin embargo si se repite la experiencia utilizando suero monovalente (F(ab)₂) anti-Ig, se observará un anillo liso de fluorescencia en la superficie. La interpretación de estos hallazgos es que las SIg está flotando libremente sobre la superficie y son aglutinadas en pequeños "parches" por el

el suero divalente anti-Ig. Si se aumenta la temperatura del medio en que se hallan los linfocitos, los "parches" convergen y forman una especie de cofia ("cap") en un polo de la célula, y los inmunocomplejos se internan en el citoplasma por endocitosis, dejando la superficie carente de Ig (106).

Otros inconvenientes de estos métodos se refieren a la dificultad para identificar los diferentes elementos celulares. En especial los monocitos llegan a ser difíciles de diferenciar de los linfocitos (111). De otra parte, existen fenómenos puramente electrostáticos que originan la union de los inmunocomplejos (de caracter electronegativo) a los tejidos cargados positivamente. Además, la reacción de inmunofluorescencia deberá contar con todos los testigos posibles, pues ciertas sustancias son espontáneamente fluorescentes (autofluorescencia).

Por lo que respecta a la estabilidad y grado de pureza de los Ac conjugados con fluorocromos hay que indicar que ambos parámetros son problemáticos. Así, estos conjugados son relativamente estables, pero en una suspensión se encuentran además Ac y moléculas de fluorocromos libres. Por otro lado, la presencia de Ac "contaminantes" plantea la necesidad de utilizar diluciones elevadas del antisuero madre, hecho no siempre realizable por la pérdida de tinción que conlleva.

Finalmente, la fluorescencia caduca sobre las 36-72 horas de forma gradual, no siendo posible el almacenaje de las muestras.

LOS METODOS INMUNOPEROXIDASICOS

Entre los métodos inmunocitoquímicos, el empleo de enzimas como marcadores de Ig ha supuesto un importante avance científico. El aprovechamiento de sus cualidades citoquímicas e histoquímicas aporta numerosas ventajas en comparación a la inmunofluorescencia, mejorando la calidad de los resultados y ampliando el campo de sus aplicaciones desde el microscopio óptico al electrónico de transmisión.

Inicialmente, las técnicas inmunoenzimáticas fueron introducidas en la Histopatología. En 1966, Ram, Nakane y Rawlinson utilizan por primera vez Ac conjugados con una enzima: la fosfatasa ácida. En sucesivos estudios, Nakane y Pierce (86, 87) experimentan, a nivel óptico y a ultraestructura, con Ac conjugados con fosfatasa ácida destacando la facilidad de su localización y la notable conservación de la morfología celular, si bien observan la inestabilidad de los complejos Ig-fosfatasa ácida y lo dificultosa que es su obtención. Por tales motivos ensayan con la peroxidasa del rábano (PR), enzima fácil de obtener comercialmente en forma relativamente pura, y que no presentaba los inconvenientes mostrados por la fosfatasa ácida. De ahí surgen los denominados métodos de inmunoperoxidasa ó inmunoperoxidásicos.

La expansión de estas técnicas, y su evolución durante la pasada década, ha sido estimulada fundamentalmente por los inconvenientes de los métodos de inmunofluorescencia, que podríamos resumir en los siguientes puntos (26, 85, 127):

- 1º Dificultad de aplicación en estudios ultraestructurales.
- 2º Ausencia total o parcial de los aspectos morfo-

lógicos celulares y tisulares.

3º Pérdida de la fluorescencia a las 36-72 horas.

4º Requerimiento de material fresco, ó especialmente procesado.

5º Necesidad de un microscopio con fuente de luz UV, que encarece el aspecto económico del método.

Tales razones motivaron el desarrollo de los métodos inmunoperoxidásicos, que actualmente podemos clasificar en los grupos siguientes:

1.- Métodos de anticuerpos conjugados con peroxidasa:

- Directo
- Indirecto

2.- Métodos de anticuerpos no conjugados con peroxidasa:

- Método del "puente" Ig-enzima
- Método del PAP
- Método del sistema Biotina-avidina-peroxidasa.

Método directo de anticuerpos (Ac) conjugados con peroxidasa (PR).-

Este procedimiento fué diseñado originalmente por Nakane y Pierce (86), e implica la utilización de un Ac, con una especificidad determinada, conjugado con una molécula de PR por medio de un compuesto químico que actúa de enlace entre la Ig y la PR.(Fig. 6-A).

Se ha aplicado con resultados positivos en estudios de microscopía electrónica(86, 140). En cambio, en microscopía óptica sus resultados no han sido tan buenos debido a la presencia de especificida-

○ : PEROXIDASA DEL RABANO

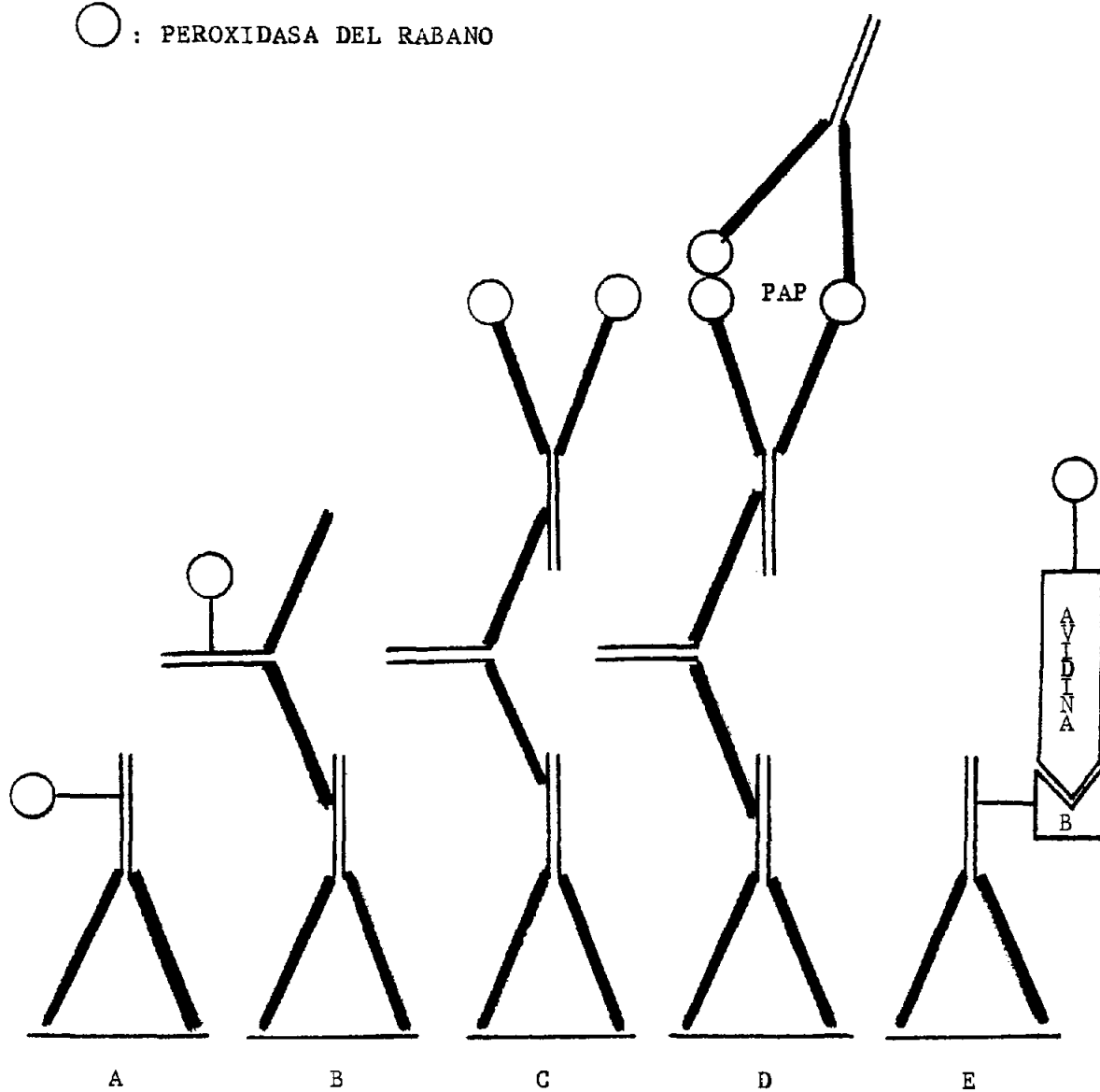


FIGURA 6

des no deseadas, a la unión de la Ig a receptores Fc en material fresco, y a la competencia de afinidades establecida entre el cuerpo químico que actúa de enlace entre el Ac y la enzima, y la propia PR, con respecto al Ac. Este último factor es quizá el mayor inconveniente del método, ya que dificulta la obtención de complejos Ig-PR. Se basa en que siendo el Ac utilizado una IgG, cuyo peso molecular se sitúa entre 150.000 y 170.000 daltons, tiene una apetencia por el cuerpo químico de enlace (el 4-4'-difluor-3-3'-dinitrofenilsulfona en el caso de Nakane y Pierce) hasta sesenta y seis veces superior a la que muestra por la PR, cuyo peso molecular es considerablemente superior (aprox. 55.000 daltons)(114).

Método indirecto de anticuerpos (Ac) conjugados con peroxidasa (PR).-

El método indirecto es similar al que se aplica en la inmunofluorescencia (25). Consiste pues, en la incubación del material en una solución de Ac específico obtenido en un animal A, seguida de una nueva incubación en una solución de un segundo Ac, con especificidad anti-IgG de A, conjugado con PR.(Fig. 6-B).

Esta variante de la técnica, también realizada por Nakane y Pierce (87), supuso una mejora en la especificidad y en la sensibilidad con respecto al método directo en la que la mayoría de los investigadores están de acuerdo (114, 130), ofreciendo una alternativa ventajosa con importante ^{aumento} ~~reducción~~ de las especificidades y disminución parcial de la tinción de fondo.

Tanto en el método directo como en el indirecto, la demostración citoquímica de la PR se realiza mediante el método de Graham y Karnovsky (46), que utiliza como cromógeno el tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobencidina, de probada estabilidad durante las fases de oxidación y

polimerización (adquisición macroscópica del color).



Métodos de anticuerpos (Ac) no conjugados con enzimas:

La problemática planteada por la existencia de la tinción de fondo, orientó a los investigadores a prescindir de los antisueros obtenidos a base de Ig unidas a moléculas de PR, y a introducir dos elementos nuevos: el primero, un nuevo anticuerpo que actuaría como enlace o "puente" entre la Ig específica de Ag y un segundo elemento integrado por Ig con especificidad de PR.

Método del "puente" inmunoglobulina-enzima.-

En 1969, Mason, Phifer, Spicer, Swallow y Deskin (79) aportan a la inmunohistoquímica un nuevo procedimiento que obvia la necesidad de la conjugación química con enzimas o fluorocromos, y que consiste en resumen en la sustitución de la conjugación por una reacción de tipo Ag-Ac entre la PR y una IgG específica anti-PR. Este método, denominado por sus autores "immunoglobulin-enzyme bridge method" ó método del puente inmunoglobulina-enzima, implica los siguientes pasos (Figura 6-C):

a) Incubación de la muestra problema en una solución de Ig, obtenidas de una determinada especie animal A, específica contra un antígeno que se desea demostrar.

b) Segunda incubación en una solución de Ig, obtenida en una especie animal determinada B, con especificidad anti-Ig de A. La concentración de Ig en este antisuero debe hallarse en exceso con respecto al primero, con la finalidad de que muchos de los Ac añadidos se fijen a los primarios por uno de sus fragmentos Fab, que-

dando libre el otro.

c) Tercera incubación, en una solución de Ac anti-peroxidasa, obtenidos en un animal de la especie A (la misma del Ac primario).

d) Cuarta incubación, en una solución de PR, en una concentración no superior a 1,25 mg en 100 ml, para evitar la tinción de fondo ocasionada por la fijación simple de moléculas de PR a la muestra.

Finalmente, la actividad peroxidásica incorporada a la muestra es demostrada por el método de Grahan y col.

No obstante, esta variante del método inmunoperoxidásico tiene un inconveniente, ya observado por Mason y cols. (79), según el cual el antisuero anti-PR contiene otros Ac "contaminantes", sin afinidad por la PR, que disminuyen sensiblemente la sensibilidad de la técnica. La solución a este problema, requiere la obtención de Ac anti-PR altamente purificados.

Método de los complejos peroxidasa-antiperoxidasa (PAP).-

La solución a los problemas del método del "puente" inmunoglobulina-enzima fué aportada por Sternberger, Hardy, Cuculis y Meyer (1970)(116), desarrollando un método para la demostración histoquímica de antígenos basado en el empleo de Ac no conjugados e integrados en complejos inmunes, muy estables, constituidos por moléculas de PR unidas a Ig anti-PR. (Figura 6-D).

Sternberger y cols. simplificaron el método de Mason y cols., estableciendo el procedimiento inmunoperoxidásico en la siguientes etapas:

1a.- Incubación de la muestra en una solución de Ac

específico contra un Ag que se desea demostrar, obtenido en un animal de la especie A (Ac primario).

2a.- Incubación en una solución de Ac, obtenidos en un animal de la especie B, con especificidad contra IgG de la especie A (Ac secundario ó "puente").

3a.- Incubación en una solución de complejos solubles de PR-anti-PR (complejos PAP), habiendose obtenido las Ig en un animal de la especie A.

La demostración histoquímica de la peroxidasa del rábano se realizaba igualmente por el método de Grahan y col. Finalmente, las preparaciones eran introducidas en una solución de tetróxido de osmio, que forma con la diaminobencidina (DAB) un compuesto intensamente electrodensó útil para la microscopía electrónica de transmisión.

El procedimiento seguido por los autores de este método para la obtención de los complejos solubles PAP, consistía en la precipitación de moléculas de PR con Ac específicos, obtenidos en conejo, en proporciones equivalentes. El precipitado era solubilizado y lavado del exceso de PR, realizandose de forma inmediata una neutralización y separación de los complejos PAP de la PR por semisaturación con sulfato amónico.

Según los datos facilitados por Sternberger y cols., los complejos solubles PAP tienen la particularidad de estar integrados, en su mayoría, por dos moléculas de IgG y tres de peroxidasa, con un peso molecular de 429.000 daltons, un corpontamiento heterogéneo en la electroforesis y homogéneo por sedimentación y difusión. Vistos al microscopio electrónico muestran una configuración pentagonal de unos 205 Å de

diámetro mayor, faltando ocasionalmente alguno de los lados.

Las cualidades más destacadas de este procedimiento son (114, 115):

- Sensibilidad elevada
- Gran especificidad
- Escasa tinción de fondo

Habitualmente en el método del PAP, tanto el Ac primario como los que constituyen los complejos solubles pertenecen a la misma especie animal. Sin embargo, cabe la posibilidad de que ambos pertenezcan a especies animales diferentes, y sean por tanto heterólogos. Este hecho fué demostrado por Erlandsen, Parsons, Burke, Redick, Van Orden y Van Orden (39) al determinar insulina, glucagon y hormona del crecimiento en ratas, a ultraestructura; utilizaron un Ac primario procedente de cobaya (anti-insulina y anti-glucagon) y de mono (anti-somatotropa), un Ac secundario (anti-IgG de conejo) obtenido en cabra, y los complejos PAP con IgG de conejo. Los resultados demostraron la reactividad cruzada entre los anticuerpos primario y el secundario.

No obstante, si bien es cierto que estas modificaciones abren nuevas perspectivas y facilitan determinados aspectos técnicos, también es cierto que, como señala Montero (85), no son precisamente sencillas de llevar a la práctica.

Por otra parte, el método de Sternberger y cols., como todos los métodos inmunocitoquímicos, requiere el empleo de testigos, positivos y negativos, para lograr una fiabilidad máxima en los resultados. Estos, se deben realizar paralelamente al menos una vez en cada caso (85), siendo los medios más idóneos:

- 1.- La absorción del Ac primario con el Ag específico.

2.- Sustitución individual o combinada de los Ac primario y secundario por solución de amortiguador.

3.- Valoración del grado de inhibición de la peroxidasa endógena por aplicación directa de la DAB sobre la preparación.

4.- Empleo de preparaciones de casos negativos y positivos conocidos, como referencia.

El tercer punto citado se refiere a la inhibición de la actividad peroxidásica endógena en la preparación. Dado que en esta técnica la demostración de la presencia de un determinado Ag se realiza por medio de la puesta de relieve de una actividad peroxidásica exógena, es decir adicionada a la preparación, es necesario, pues, eliminar previamente toda actividad enzimática de la preparación que pueda originar confusión en la interpretación de los resultados.

Diversos procedimientos han sido propuestos para inhibir dicha actividad. Así Strauss en 1971 propuso el empleo de una mezcla de metanol, nitroferricianuro sódico y ácido acético en los procedimientos de inmunoperoxidasa; un año más tarde propone un método alternativo basado en la utilización de la fenilhidrazina, sustancia capaz de reaccionar con la fracción no "hem" de la PR suprimiendo su actividad, aunque con la particularidad de que no inhibía la actividad peroxidásica de los eosinófilos (134). Casi simultáneamente, Streefkerk (118) publica una nueva metodología para inhibir la actividad peroxidásica en las preparaciones, especialmente la pseudoperoxidásica de los hematíes, basada en el empleo de una mezcla de metanol y peróxido de hidrógeno, con unos resultados tan positivos que justifican su amplia difusión.

En cuanto a las aplicaciones de los métodos de inmunoperoxidasa, Dellelis, Sternberger, Risa, Mann, Banks y Nakane (29)

han realizado recientemente una completa revisión, que abarca desde la demostración histológica y citológica de enzimas (lisozima, fosfatasa ácida, etc), hormonas (hipofisarias, pancreáticas, tiroideas, etc) e Ig, hasta la demostración de partículas virales, pasando por numerosas sustancias tales como el antígeno carcinoembrionario, la alfafetoproteína, la caseína, etc, e incluso en bandeo de cromosomas (67).

Finalmente, hemos de indicar que el método del PAP ha sido objeto recientemente de diversas modificaciones con objeto de potenciar su sensibilidad sin afectar a su especificidad. Así, Erlandsen, Parsons y Rodning (40), tras la aplicación del Ac primario, proponen la realización de varios ciclos de Ac secundario y complejos PAP para incrementar la inmunotinción (tal modificación fué aplicada con buenos resultados en preparaciones tisulares de rata procesadas para estudio a ultraestructura). Por su parte, Vacca, Rosario, Zimmermann, Tomashefsky, Po-ying y Hsu (132) realizan varios ciclos de Ac primario y Ac secundario, tras los cuales aplican en una sólo etapa los complejos solubles PAP. En la misma línea de trabajo, Su-Ming y Reed (119), con la intención de amplificar la reacción colorante, establecen un método que denominan "self-sandwich" (auto-sandwich) y que consiste en aplicar sucesivamente varias "capas" de Ac primario y del Ag que se pretende demostrar, tras lo cual se prosigue hasta completar el proceso del PAP.

De otra parte, Zehr (145) aplica una solución de peróxido de hidrógeno y albúmina de huevo previamente al Ac primario, en preparaciones histológicas, con la finalidad de reducir al mínimo la tinción de fondo presente.

Ademas, el método del PAP se ha empleado tambien en combinación con otras técnicas inmunocitoquímicas, especialmente en

la demostración simultánea de más de un antígeno, como es el caso de la utilización de la fosfatasa alcalina como marcador inmunoenzimático realizada por Mason y Sammons (76) para la demostración de ambas cadenas ligeras en células plasmáticas, y de cadenas ligeras y enzimas en las células de cortes histológicos y aspirados de médula ósea.

Método biotina-avidina-peroxidasa (BAP).-

Este método es el último conocido de los inmunoperoxidásicos. Se fundamenta en la tendencia a reaccionar entre la biotina y la avidina. La biotina es una vitamina hidrosoluble que sirve como grupo prostético de una serie de enzimas, cada una de las cuales cataliza la fijación de CO_2 con enlaces orgánicos. Dicha vitamina tiende a combinarse (no se sabe en que manera) con una proteína de peso molecular 45.000 que se aisló de la clara de huevo cruda, y que se denomina avidina.

Este método, aplicado por Warnke y Levy a la demostración de Ag en los linfocitos T y B (139), consiste en la aplicación de un Ac primario de especificidad anti-Ag, obtenido en un animal A; en una segunda etapa se adiciona un Ac de especificidad anti-IgG de A, obtenido en un animal B, y conjugado con biotina; en una tercera etapa se incuba la preparación en una solución de avidina conjugada con PR, realizándose la demostración citoquímica de la peroxidasa por el método de Grahan y col. (46) (Figura 6-E).

APLICACIONES DE LOS METODOS INMUNOPEROXIDASICOS EN LA HEMATOLOGIA

Aplicaciones al diagnóstico histopatológico.-

Los métodos inmunoperoxidásicos han experimentado en los últimos años un gran desarrollo en sus aplicaciones en el diagnóstico anatomopatológico de numerosas hemopatías malignas, teniendo especial relevancia las investigaciones realizadas sobre ganglios linfáticos normales y patológicos.

La mayoría de los estudios se encaminan a la demostración de Ag linfocitarios; en primer lugar las Ig. Otros aspectos de la investigación se dirigen a la determinación de marcadores de células B y T, y de marcadores de exclusión de la serie linfoide como la lisozima, enzima que juega un importante papel en la tipificación de los elementos celulares del sistema mononuclear fagocítico, principalmente los histiocitos.

Los linfomas han supuesto un inmenso campo de trabajo, incidiendo los métodos inmunoperoxidásicos especialmente sobre los aspectos inmunológicos de la cuestión, como lo demuestra la abundante literatura publicada (1, 5, 6, 8, 22, 27, 28, 50, 54, 55, 59, 90, 91, 99, 110, 112, 121, 122, 123, 124, 125, 133, 138, 139).

Por otra parte, la biopsia de médula ósea también ha sido objeto de estas técnicas, si bien con menos frecuencia, y casi siempre en relación con los aspectos inmunológicos de las discrasias de células plasmáticas. Así Taylor (128), en una revisión de gammopatías monoclonales estudiadas por el método del PAP, observa una excelente correlación entre los patrones inmunoelectroforéticos del suero y de la orina y los resultados del método inmunocitoquímico, si bien en más de

la mitad de los casos de enfermos con mieloma Bence-Jones investigados, existe una disarmonía entre ambos parámetros, demostrándose inmunocitoquímicamente la existencia de cadenas polipeptídicas intracelulares que no se detectan ni en el suero ni en la orina. También Pinkus y Said (97), en 47 pacientes con mieloma múltiple, demuestran una excelente concordancia entre los resultados obtenidos por el método del PAP y la inmunoelectroforesis, dilucidando además la clona inmunológica proliferante en tres casos de mieloma no secretor; la correlación se mantuvo en 4 casos de macroglobulinemia de Waldeström. También Clausen, Jacobsen, Johansen y Thomsen obtienen resultados similares en 34 pacientes con mieloma múltiple (22).

Aplicaciones al diagnóstico citológico.-

Los logros alcanzados por los métodos inmunoperoxidásicos a nivel de tejidos, estimularon a algunos investigadores a adaptarlos a la citología, concretamente en la sangre periférica y aspirados de la médula ósea.

En 1975, Mason, Taylor y Farrell (73), adaptan por primera vez el método del PAP a extensiones hematológicas secadas al aire, demostrando Ig, lisozima y lactoferrina, y llaman la atención sobre la importancia que la fijación y la contratinción reúnen sobre la sensibilidad e interpretación de los resultados. Simultáneamente, Mason y Taylor (78) ponen a punto un método de sandwich asociado al PAP, para la demostración de Ag A (del sistema sanguíneo ABO) en la superficie de los hematíes hemoperiféricos.

En 1977, Lees (65) aplica el método directo de Ac conjugados con PR (conjugación química realizada según el procedimiento de Avrameas (4) con glutaraldehído) a la demostración de SIg en extensiones de linfocitos de la sangre periférica, señalando la similitud en

tre la sensibilidad de la técnica inmunoenzimática y la inmunofluorescencia, si bien destacando la superioridad que proporciona el reconocimiento de la morfología de las células.

Recientemente, los métodos inmunoperoxidásicos han sido sometidos a tecnificación automática aplicada a la tipificación de los linfocitos B y T. Para ello se ha recurrido al Hemalog D, aparato que realiza la fórmula leucocitaria por análisis del tamaño y del contenido enzimático de las células en flujo continuo (31, 32, 34, 35, 36). Tal perfeccionamiento se ha desarrollado sobre la investigación de SIg en los linfocitos hemoperiféricos B normales y de la leucemia linfóide crónica, en los que se ha llegado a cuantificar el número aproximado de moléculas de SIg por microdensitometría (32, 33).

Por otra parte, se han estudiado los efectos de los fijadores sobre la sensibilidad del método. Y así, Reitamo, Ranki, Kontinen y Häyry (104), al demostrar por el método del PAP las SIg y CIg en extensiones de linfocitos de la sangre periférica previamente aislados en un gradiente de Ficoll-Hypaque y cultivados en un medio con mitógenos, comparan los efectos del formaldehído-acetona tamponado, propuesto por Mason y cols. (73), y del formaldehído-calcio de Baker, observando la mejor conservación de la antigenicidad de las Ig logradas por este último.

Otra aplicación de gran interés de estas técnicas es la demostración de Ig unidas a plaquetas, especialmente en el diagnóstico de las purpuras trombopénicas de origen inmune. En esta línea, Le Porrier, Dighiero, Aurzemy y Binet (64) han utilizado un método directo de Ac conjugados con PR para la demostración y cuantificación de las Ig plaquetarias en pacientes diagnosticado de purpura trombopénica inmu

nológica, realizando un análisis comparativo con individuos normales y valorando los efectos del tratamiento. Igualmente, Piquet, Venzon, Moulinier y Angevain (98) desarrollan una metódica para el estudio y titulación de Ig en la membrana plaquetaria por una técnica de sandwich en combinación con Ac conjugados con PR.

En cuanto a los enzimas intracelulares, la lisozima (muramidasa) ha revestido especial interés en el estudio de las series granulocítica y mononuclear-fagocítica (sistema monocito-macrófago). Orientados inicialmente tales estudios en el terreno de la histopatología (96, 77) por métodos inmunoperoxidásicos, en la citología las primeras determinaciones se realizan por inmunofluorescencia (3). Corresponde a Mason y cols. (73) el mérito de la demostración de la lisozima en células de la sangre periférica y de la médula ósea, en extensiones, por medio del método del PAP, y es el mismo Mason (71) quien investiga la presencia de esta enzima en los síndromes mieloproliferativos malignos agudos y crónicos, en la anemia sideroblástica primaria y en la hemoglobinuria paroxística nocturna, valorando su papel como marcador de exclusión de las células de estirpe linfoide. Desde tales bases, la lisozima se empieza a considerar cada vez más como un parámetro valorable en el contexto de las hemopatías malignas (41, 71, 80) y como índice del funcionalismo de las células granulocíticas en la respuesta a la infección (71, 103).

Por otra parte, estos métodos también se han aplicado a la demostración de la deosinucleotidil transferasa terminal (TdT), proteína característica de ciertos linfocitos del timo normal y de la médula ósea que parece que se encuentra elevada cualitativa y cuantitativamente en los linfoblastos leucémicos, especialmente de origen T (9, 61)

y ocasionalmente en blastos que poseen marcadores B (108). Recientemente Jäger (1981)(57) ha demostrado la presencia de la TdT en células de aspirado de médula ósea, mediante el método del PAP, a nivel del microscopio de luz. Por su parte Steinmann, Mertelmann, Silverstone y Etienne, con el mismo procedimiento, la han demostrado a nivel ultraestructural en linfoblastos procedentes de cultivo (113), dándose el hecho curioso que la enzima se demostró en el citoplasma de la célula, y no en el núcleo como era de esperar.

Finalmente, mencionaremos la demostración inmunoperoxidásica de la lactoferrina, enzima presente en la granulación secundaria o específica de los granulocitos neutrófilos, y que también ha sido demostrada en extensiones celulares de sangre periférica y de aspirados de médula ósea (71, 73, 103) habiendo sido valorada en relación al déficit de la granulación específica en niños con infecciones recurrentes (13).

MATERIAL Y METODO

MATERIAL

Casística

Se ha realizado un estudio inmunoperoxidásico de las Ig celulares en extensiones de concentrados linfocitarios de la sangre periférica y de aspirados de médula ósea, secadas al aire. La casuística aportada está compuesta por 35 individuos examinados en el Servicio de Hematología y Hemoterapia de la Ciudad Sanitaria de la Seguridad Social "Virgen del Rocío" de Sevilla.

La relación de casos estudiados es la siguiente:

Leucemia linfoide Crónica (LLC).....	11 casos
Leucemia de células linfosarcomatosas (LCL).....	2 "
Síndrome de Sézary.....	1 "
Leucemia linfoblástica aguda (LLA).....	7 "
Mieloma múltiple.....	6 "
Mieloma Bence-Jones.....	1 "
Macroglobulinemia de Waldeström.....	1 "
Plasmocitosis reactiva.....	2 "
Linfomas.....	2 "
Donantes de sangre sanos.....	2 "

El estudio inmunoperoxidásico sobre concentrados

linfocitarios de la sangre periférica se realizó en las LLC, LCL, LLA, síndrome de Sézary y en los donantes de sangre sanos. Además, en uno de los linfomas el examen se practicó sobre una suspensión celular obtenida a partir de una adenopatía biopsiada. En los restantes casos los estudios se llevaron a cabo sobre extensiones de aspirados de médula ósea.

La mayoría de los casos fueron analizados en el momento del diagnóstico, previamente al tratamiento, a excepción de cuatro casos de LLC, uno de LLA, dos mielomas múltiples y del paciente con el síndrome de Sézary, quienes se encontraban en fases de recaída o de no remisión de la enfermedad fundamental.

Extensiones

Hemos demostrado la presencia de cadenas inmunoglobulínicas y de lisozima (muramidasa) en extensiones de leucocitos de la sangre periférica y de aspirados de médula ósea.

Las muestras han sido tomadas de sujetos normales (donantes de sangre) y de pacientes afectados por diversos síndromes linfoproliferativos malignos.

Antisueros

Sueros de conejo anti-humano, específicos contra cadenas pesadas de IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, contra las cadenas ligeras kappa y lambda y contra lisozima, suministrados por DAKO-Immunoglobulins (Denmark) a través de su distribuidor en España, ATOM (Barcelona). De igual procedencia son el suero de cerdo específico contra IgG de conejo y los complejos solubles PAP.

METODO

Extracción y elaboración de las extensiones

Las muestras de la sangre periférica fueron extraídas por venoclisis, procediéndose a la separación de los linfocitos en un gradiente de Ficoll-Paque. Para ello, se utilizó sangre desfibrinada y desplaquetizada con bolitas de vidrio, procediéndose seguidamente a diluir el volumen obtenido al 50 por 100 en amortiguador PBS; la solución sanguínea así obtenida, se centrifugó en un medio con Ficoll-Paque durante 20 minutos a 1.000 g, tras lo cual se retiró la capa media linfocitaria y se procedió a lavar tres veces con amortiguador PBS, dejando finalmente la suspensión celular incubada a 37°C durante treinta minutos, para desprender las IgG citofílicas (método de Lobo y cols) (66).

Al paquete linfocitario resultante, se añadió albúmina bovina al 30 por 100 en una proporción no superior al 2 por 100. A continuación se realizaron las extensiones, dejándolas secar al aire durante unos minutos.

En la demostración de lisozima en leucocitos de la sangre periférica y de los aspirados de médula ósea, las extensiones se estudiaron sin lavado previo de la celularidad.

En cambio, para la demostración de Ig en los aspirados de médula ósea, este material se lavó con PBS antes de realizar las extensiones. Para ello, dos o tres gotas de aspirado eran suspendidas en 10 c.c. de tampón en un tubo cónico de centrífuga, mezclándose cuidadosamente con una pipeta de Pasteur y centrifugándose a 250 g durante 15 minutos. El paquete resultante era mezclado con albúmina bovina de igual

manera que en los concentrados de linfocitos hemoperiféricos. Las extensiones se efectuaban de inmediato y se dejaban secar al aire. La finalidad de esta elaboración es la eliminación de los Ac sobrenadantes en el plasma.

La aspiración de material medular se practicó habitualmente por punción percutánea en cresta ilíaca postero-superior, por lo general con aguja especial B-D (Beckton-Dickinson and Company) y ocasionalmente con agujas de aspiración y biopsia tipo Janshidi. En casos aislados, la punción con aguja B-D se realizó en esternón.

Se emplearon regularmente portaobjetos limpiados por tres métodos indistintamente: a) inmersión durante 24 horas en mezcla sulfocrómica (60 cc de ácido sulfúrico más 40 cc de dicromato potásico en solución saturada); b) lavado en alcohol metílico; y c) frota-dos con compresas de hilo.

Con respecto a la antigüedad de las extensiones, para la demostración de Ig se almacenaron entre 4º y 6ºC -previamente fijadas-, procesandose las extensiones hasta un máximo de 7 días, en el caso de los concentrados de linfocitos, y hasta 30 días en el caso de los aspirados de médula ósea. En cambio, para la determinación de lisozima, se utilizó material de hasta un año de antigüedad, sin fijar, y almacenado a temperatura ambiente.

Fijación

En los aspirados de médula ósea de pacientes con discrasias de células plasmáticas, se valoró el efecto de la fijación sobre la antigenicidad de las Ig y sobre la morfología celular. Para ello se ensayaron los fijadores siguientes:

- 1.- Vapores de formaldehido durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 minutos.
- 2.- Metanol puro, a temperatura ambiente, durante 2, 6 y 10 minutos.
- 3.- Peróxido de hidrógeno (de 110 volúmenes) al 1 por 100 en metanol, a temperatura ambiente, durante 30 minutos.
- 4.- Solución de formaldehido al 10 por 100 en etanol, a temperatura ambiente, durante 30 segundos.
- 5.- Solución de formaldehido al 50 por 100 en etanol, a temperatura ambiente durante 30 segundos.
- 6.- Solución de formaldehido tamponado: 100 ml de formaldehido + 900 cc de agua destilada + 6,5 gr de fosfato sódico dibásico (PO_4HNa_2) + 4 gr de fosfato sódico monobásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$). Tiempos de fijación: 5, 6 y 8 minutos.
- 7.- Solución de formaldehido-acetona tamponada (método de Mason y cols)(73).
- 8.- Solución de formaldehido-calcio de Baker, a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 9.- Solución de acetona al 60 por 100 en agua destilada, a 42-62 C durante 30 segundos.

En las extensiones de concentrados linfocitarios, en las que se demostraron Ig, se valoraron los efectos del formaldehido calcio y de la solución tamponada de formaldehido acetona.

Solución reveladora

Empleamos como sustrato cromógeno el tetraclorhidrato de 3, 3' diaminobencidina (DAB), suministrado por SIGMA BIOCHEMICAL (Saint Louis, Mo., USA).

La solución reveladora se constituye con 3-4 mgrs de DAB, 10-12 cc de amortiguador TRIS 0,05 M, a pH 7,3-7,6, y 20 lambdas de agua oxigenada de 110 volúmenes. Una vez bien disuelta la DAB y homogeneizada la mezcla, se filtra a través de papel para análisis gravimétrico Albet, quedando así la mezcla preparada para su utilización. Todo este proceso se realiza a temperatura ambiente, empleandose la solución reveladora inmediatamente a su preparación, no almacenandose para uso posterior.

El amortiguador TRIS 0,05 M a pH 7,3-7,6 se preparó añadiendo 13,90 gr de Trizma HCl y 60,60 gr de Trizma Base (tris-hidroximetil-aminometano), suministrados ambos por SIGMA BIOCHEMICAL, a un litro de agua destilada. El amortiguador se logra mezclando 100 c.c. de dicha solución con 900 c.c. de agua destilada.

Inhibición de la actividad peroxidásica endógena

La eliminación de la actividad peroxidásica -y pseudoperoxidásica- de la extensión, se experimentó por tres métodos:

1.- Incubación de las extensiones, previamente fijadas, en agua destilada a 80°C durante 1, 2, 3, 4 y 5 minutos.

2.- Incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos en una solución de peróxido de hidrógeno (de 110 volúmenes) al 1 por 100 en metanol.

3.- Incubación a 37°C durante 60 minutos en una mez

cla de clorhidrato de fenilhidrazina al 0,01 por 100 en amortiguador fosfato, 0,05 M a pH 7,1.

Con respecto a la inhibición en metanol/peróxido de hidrógeno, se efectuaron pruebas de incubación en extensiones de sangre periférica, fijadas por el método de Mason y cols (73), que fueron inhibidas durante 5, 10, 15, 20, 25 y 30, y a continuación expuestas a la solución reveladora. Como testigo, se empleó una extensión fijada, sin inhibir y expuesta igualmente a la solución de DAB. En estas pruebas, el tiempo de revelado fué uniformemente 30 minutos.

Procedimiento del PAP

1.- Anticuerpo Primario: se aplicó antisuero de conejo antihumano, suspendido en amortiguador TRIS salino 0,05 M a pH 7,2-7,4 (se prepara añadiendo 9 gr de ClNa en un litro de TRIS), a las siguientes concentraciones:

- Anti-IgG humana, obtenido en conejo: 1/20, 1/40, 1/80, 1/100, 1/160, 1/320, 1/400, 1/800, 1/1600.
- Anti-IgA humana, obtenido en conejo: idem.
- Anti-IgM humana, obtenido en conejo: idem.
- Anti-IgD humana, obtenido en conejo: 1/20, 1/100, 1/200 y 1/400.
- Anti-IgE humana, obtenido en conejo: idem.
- Anti-kappa humana, obtenido en conejo: 1/20, 1/40, 1/80, 1/100, 1/160, 1/320, 1/400, 1/600 y 1/800.
- Anti-lambda humana, obtenido en conejo: idem.

Todas estas diluciones se ensayaron en aspirados de médula ósea de pacientes diagnosticados de mieloma, en extensiones fijadas con formaldehído-acetona tamponado.

El anticuerpo primario se incubó en pruebas de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 60 y 90 minutos, en todos los casos a temperatura ambiente, empleando una dilución fija: 1/100 en todas las cadenas.

En la demostración de lisozima se utilizó antisue-ro de conejo anti-lisozima humana a dilución 1/100 en todos los casos.

2.- Anticuerpo Secundario o "puente": suero de cer-do anti-IgG de conejo suspendido en amortiguador TRIS salino, a dilucio-nes de 1/20, 1/40, 1/50 y 1/100. La dilución 1/50 se ensayó a 15, 30, 45 y 60 minutos. Para estas pruebas se utilizó el mismo material que para el Ac primario, y en idénticas condiciones de temperatura y fijación.

3.- Complejo PAP: los complejos solubles PAP, obte-nidos con IgG de conejo, se suspendieron en TRIS salino a diluciones de 1/40, 1/50 y 1/100, ensayandose la dilución 1/50 en pruebas cronológicas de 15, 30, 45 y 60 minutos, en el mismo material y condiciones de los Ac antes referidos.

Se efectuaron lavados intermedios con soluciones amortiguadoras; así, tras los dos primeros Ac se lavó con TRIS salino, y despues de la incubación de los complejos solubles PAP con amortigua-dor TRIS sin cloruro sódico 0,05 M a pH 7,3-7,6. Tales lavados fueron breves y cuidadosos, quedando finalmente las extensiones sumergidas en el último tampon durante unos minutos hasta la aplicación de la solu-ción reveladora.

Contratinción

- Hematoxilina de Harris con ácido acetico filtra-da: se empleó como un parámetro constante con todas las variantes de fijación, con un tiempo medio de 5 a 15 segundos. El viraje de la colo-

ración hacia la tonalidad azul-celeste se efectuó indistintamente con agua corriente, solución de carbonato de litio y solución de amoníaco al 1:500 en agua destilada.

- Giemsa: al 1/30 en agua destilada, durante 20 minutos.

- May-Grünwald: puro, durante 3 minutos.

- May-Grünwald-hematoxilina de Harris: el primero en solución concentrada durante 3 minutos, seguido de un breve lavado con agua destilada y adición de hematoxilina de Harris con ácido acético durante un máximo de 5 minutos.

- Giemsa-hematoxilina de Harris: Giemsa al 1/30 durante 3 minutos, seguido de lavado con agua destilada y adición de hematoxilina de Harris durante un tiempo máximo de 5 minutos.

Una vez realizada la contratinción, las extensiones fueron secadas al aire durante unos minutos, sin que en ningún caso se practicara hidratación o deshidratación a través de alcoholes.

Testigos

- Extensiones de casos positivos conocidos.

- Omisión individual o combinada de los anticuerpos

- Absorción del Ac primario: se practicó con IgG.

Para ello se incubaron diluciones crecientes del antisuero 1/100 (0, 1/8, 1/4, 1/2 y 1) con soluciones de IgG a concentración uniforme, en proporción 1:1, y durante 12 horas a 42-62°C. La prueba se llevó a cabo sobre extensiones del aspirado de médula ósea de un paciente diagnosticado de mieloma IgG.

METODO ACEPTADO

a) Obtención y preparación del material:

1) Demostración de Ig:

- Aspirado de médula ósea: se realizó un lavado del aspirado (2-3 gotas) en amortiguador fosfato (PBS); a continuación se añadió albúmina bovina (1-2 por 100) y se practicaron extensiones finas sobre portas frotados con compresas de hilo.

- Concentrado de linfocitos hemoperiféricos: separación de los linfocitos en un gradiente de Ficoll-Paque, seguido de tres lavados en PBS e incubación de la última suspensión a 37°C durante 30 minutos; tras centrifugar y retirar el sobrenadante, se adicionó albúmina bovina y se procedió a realizar extensiones finas a partir del paquete linfocitario obtenido.

Las extensiones así obtenidas se fijaron en un plazo máximo de dos horas, almacenándose a 4°C-6°C un tiempo máximo de 72 horas antes de su procesamiento.

2) Estudio de lisozima:

- Aspirado de médula ósea: extensiones finas del aspirado, directamente realizadas tras la punción, sin lavado del material.

No se investigó en los concentrados linfocitarios procedentes de la sangre periférica.

Se aceptó para estudio material de hasta tres meses sin fijar.

b) Fijación:

1) Demostración de Ig:

- Aspirado de médula ósea: indistintamente formaldehído-acetona tamponado y acetona al 60 por 100 en agua destilada a 42-62C, ambos durante 30 segundos.

- Concentrado de linfocitos hemoperiféricos: formaldehído-calcio de Baker durante 5-6 minutos, a temperatura ambiente.

2) Estudio de lisozima:

- Aspirado de médula ósea: formaldehído-acetona tamponado, a temperatura ambiente, durante 30 segundos.

c) Inhibición de la actividad peroxidásica endógena:

Peróxido de hidrógeno, de 110 volúmenes, al 1 por 100 en metanol, durante 20 minutos y a temperatura ambiente.

d) Método inmunoperoxidásico:

1) Demostración de Ig:

- Aspirado de médula ósea:

Ac primario a dilución 1/100, 30 minutos.

Ac secundario a dilución 1/50, 15 minutos.

Complejos PAP a dilución 1/50, 15 minutos.

- Concentrado de linfocitos hemoperiféricos:

Ac primario:

Cadenas pesadas: dilución 1/100, 30 minutos.

Cadenas ligeras: dilución 1/200, 30 minutos.

Ac secundario a dilución 1/50, 15 minutos.

Complejos PAP a dilución 1/50, 15 minutos.

En los casos en que por diversas causas el patrón de tinción fué debil, se recurrió a duplicar parcialmente el método del PAP realizando un segundo ciclo de Ac secundario-complejos PAP, según el postulado de Erlandsen y cols. (40).

2) Estudio de lisozima:

- Aspirado de médula ósea:

Ac primario a dilución 1/200, 30 minutos.

Ac secundario a dilución 1/50, 15 minutos.

Complejos PAP, a dilución 1/50, 15 minutos.

Los lavados intermedios se realizaron con amortiguador TRIS salino, excepto el de los complejos solubles PAP que se llevó a cabo con amortiguador TRIS.

e) Revelado de la peroxidasa exógena:

- Solución de diaminobencidina (DAB), según el método de Grahan y Karnovsky (46).

f) Contratinción:

1) Demostración de Ig:

- Aspirado de médula ósea: May Grünwald-hematoxilina de Harris.

- Concentrado de linfocitos hemoperiféricos: hematoxilina de Harris.

2) Estudio de lisozima:

- Aspirado de médula ósea: Hematoxilina de Harris.

Opcionalmente, algunas extensiones se protegieron con un cubreobjeto mediante DPX.

g) Controles:

Habitualmente se empleó como testigo negativo una extensión en la que se omitieron el Ac primario o/y el Ac secundario. En un caso de mieloma IgG, se realizó la absorción del Ac primario anti-IgG con IgG humana, y cuando fué posible se utilizaron como testigos positivos extensiones de casos conocidos.

RESULTADOS

LEUCEMIA LINFOIDE CRONICA (LLC)

Los resultados del estudio inmunoperoxidásico de las Ig linfocitarias se obtuvieron, en todos los casos aportados, sobre extensiones de concentrados de linfocitos hemoperiféricos fijados en solución tamponada de formaldehido-acetona (metodo de Mason y cols., 1975)(73). Además, en los siete primeros pacientes se estudió de forma paralela los efectos de la fijación con formaldehido-calcio sobre los resultados finales del método inmunocitoquímico (Tabla I). En seis de estos últimos, se verificaron estudios complementarios con determinación de SIg por inmunofluorescencia directa con suero poliespecífico anti-IgG-IgA-IgM, de rosetas espontáneas (E) con hematíes de carnero y, finalmente, en dos se investigó por inmunofluorescencia directa la presencia del antígeno Ia-like.

En el método inmunoperoxidásico empleado, se consideró la existencia de SIg cuando la célula mostraba un velamiento difuso pardo-amarillento que cubría por igual núcleo y citoplasma, dificultando ligeramente la identificación de las redes cromatínicas nucleares. Este tipo de tinción suele mostrar con frecuencia un halo de refuerzo perifé-

TABLA I.

ESTUDIO INMUNOPEROXIDASICO DE LAS Ig DE LOS LINFOCITOS HEMOPERIFERICOS DE PACIENTES AFECTADOS DE LEUCEMIA LINFOIDE CRONICA (LLC).

Caso	Fijación	Estudio inmunoperoxidásico(%)							IF(%)	Rosetas	E(%)
		IgG	IgA	IgM	IgD	IgE	kappa	lambda			
1º	F.A.	E	E	O	O	O	E	E	0	4	
J.R.F.	F.C.	E	2	77	E	O	84	E			
2º	F.A.	O	O	O	O	O	E	O	82	5	
F.R.L.	F.C.	E	O	96	O	O	99	E			
3º	F.A.	O	O	O	O	O	O	E	13	59	
M.C.S.	F.C.	3	12	E	6	O	4	24			
4º	F.A.	O	O	O	O	O	O	O	-	-	
E.S.S.	F.C.	96	98	O	O	O	92	96			
5º	F.A.	O	O	O	O	O	O	O	4	5	
M.F.D.	F.C.	E	O	78	E	O	E	97			
6º	F.A.	O	O	O	O	O	E	O	0	7,5	
J.S.S.	F.C.	83	E	2	3	E	98	E			
7º	F.A.	O	O	E	O	O	O	E	0	5,5	
S.R.G.	F.C.	E	E	84	12	O	E	89			
8º	F.A.	E	O	O	O	O	E	E	-	-	
A.F.R.											
9º	F.A.	40	7	3	O	O	17	13	-	-	
A.R.M.											
10º	F.A.	O	O	O	O	O	O	O	-	-	
C.M.D.											
11º	F.A.	O	O	O	O	O	O	O	-	-	
M.M.S.											

IF: inmunofluorescencia directa, poliespecífica para IgG, IgA e IgM.

F.A.: formaldehido-acetona; F.C.: formaldehido-calcio.

rico que se distingue facilmente de la tinción intracitoplásmica.

Afirmamos la presencia de cadenas inmunoglobulínicas intracitoplásmicas (CIg) cuando, con o sin la existencia de SIg, aparece una intensa tinción parda que dibuja más o menos los contornos del núcleo.

Resultados obtenidos tras la fijación con formaldehído-acetona:

a) Morfológicos: se conserva perfectamente la morfología celular, tanto la nuclear como la citoplásmica. La morfología de los eritrocitos se manifiesta nitidamente tras la contratinción con hematoxilina de Harris.

b) Inmunocitoquímicos: de los once casos analizados, los resultados no fueron valorables en diez; el porcentaje de células positivas fué siempre inferior al 1 por 100, con la particularidad de que dicha positividad correspondía al patrón definido de CIg; por lo general, la tinción se observa con una distribución periférica uniforme, aunque ocasionalmente muestra un predominio en un polo celular.

En el séptimo caso, se puso de relieve la existencia de positividad intracitoplásmica para la cadena pesada de IgM y la ligera lambda en la mayoría de los linfocitos situados en una estrecha banda que correspondía al inicio de la extensión; la celularidad del resto de la misma era absolutamente negativa. Entre los elementos positivos, y también muy aisladamente en el resto de la extensión, se pudo observar la existencia de inclusiones cristalinas positivas para las cadenas antes referidas.

Además, en el noveno paciente, a diferencia de los demás, se identificó un 40 por 100 de células positivas para CIgG y un 17 por 100 para C-kappa. En la mayoría de estos linfocitos, la tinción

mostraba una distribución de predominio polar. En este caso, se observaron porcentajes menores de células linfoides positivas para otras cadenas (Tabla I), con la peculiaridad de que en su mayoría poseían un patrón de tinción característico de SIg.

Finalmente, hemos de señalar que en los once casos estudiados, se observó una tinción débil, escasa y de aspecto granular -en cuantía variable- en los granulocitos segmentados presentes, tinción que normalmente aparecía para las cadenas pesadas de IgG e IgA y para las dos ligeras, más raramente en otras cadenas. En algunos monocitos se evidenciaba asimismo esta tinción poliespecífica, pero por lo general más débil y con un patrón de SIg.

Resultados obtenidos tras la fijación con formaldehído-calcio:

a) Morfológicos: así como la configuración nuclear se conserva con gran nitidez y en sus más mínimos detalles, no ocurre lo mismo con el citoplasma; los límites de éste aparecen ligeramente difuminados, siendo los contornos de las células poco definidos. Sin embargo, desde el punto de vista de la diferenciación morfológica de los distintos elementos celulares, los resultados son objetivamente buenos, pues si bien aparecen los defectos citoplásmicos señalados, e incluso pequeñas zonas de extracción, la caracterización de la celularidad es fácil.

En cambio, los hematíes no quedan bien fijados, y en la contratinción no aparecen, y si lo hacen es en los bordes de la extensión y en las zonas más finas de la misma.

En la serie granulocítica, existe un moderado a mediano componente de degranulación.

b) Inmunocitoquímicos: en los siete casos analizados, se identificó claramente celularidad con avidez tincional en eleva

dos porcentajes, en algunos casos cercanos al 100 por 100 de los linfocitos. Por lo general la tinción correspondía al modelo de SIg.

En cuatro pacientes se definió la existencia de una proliferación monoclonal para IgM, dos de tipo kappa (1º y 2º) y dos de tipo lambda (5º y 7º). En el séptimo paciente no se logró distinguir ninguna inclusión cristalina.

Dos casos fueron catalogados como proliferaciones monoclonales de la clase IgG y de tipo kappa (4º y 6º). En el cuarto caso se observaron porcentajes de células positivas cercanos al 100 por 100 para las cadenas pesadas de IgG e IgA (patrones de superficie) y para las dos ligeras.

En el tercer paciente estudiado, los porcentajes de células positivas no fueron claramente definitorios de la clona proliferante, si bien existía un predominio de células SIg-positivas para la cadena pesada de IgA y para kappa.(Tabla I).

Además, a igualdad de lo ocurrido tras la fijación con formaldehído-acetona, se observaba una tinción difusa en los monocitos, también poliespecífica. Este hecho se repetía en los granulocitos, aunque por lo general más débil y con un patrón granular menos acentuado.

Finalmente, realizamos la duplicación parcial del método del PAP en los casos tercero y séptimo, observando un marcado aumento de la coloración de las células positivas. Pero además, aparecía una ligera positividad de superficie en algunos linfocitos para otras cadenas inmunoglobulínicas, en proporciones variables, y que por su menor tinción se diferenciaban bastante bien de la población que fue positiva ya con el método habitual.

Con los dos métodos de fijación antes expresados, se valoraron los efectos de la antigüedad de las extensiones sobre los resultados de la técnica, observándose que cuando ésta era superior a cinco días comenzaban a aparecer modificaciones cuya frecuencia aumentaba al prolongarse la duración del almacenamiento. Entre estas modificaciones destacan:

- disminución de la intensidad de la tinción a igualdad de tiempos de revelado, hecho que obliga a prolongarlos.
- tinción indiscriminada de celularidad en distintos lugares de la extensión, principalmente la periferia, en tanto que otros permanecen sin teñir, o bien lo hacen muy debilmente (por lo general suele tratarse de la zona central de la extensión).
- negatividad absoluta.

LEUCEMIA DE CELULAS LINFOSARCOMATOSAS (LCL)

Han sido estudiados inmunologicamente los elementos linfoides de la sangre periférica de dos pacientes diagnosticados de LCL. Tal diagnóstico estaba basado en los estudios morfológicos y citoquímicos con el microscopio óptico y en los aspectos ultraestructurales de los linfocitos neoplásicos.

El método del PAP fué realizado, en ambos casos, sobre extensiones de linfocitos fijados en formaldehido-acetona taponado y en formaldehido-calcio de Baker, con la finalidad de comparar los efectos de los dos fijadores sobre los resultados finales del método inmunoperoxidásico.

Por lo que respecta a los aspectos morfológicos,

los resultados son análogos a los reseñados en el estudio de los casos de LLC.

No obstante, los resultados inmunocitoquímicos obtenidos, difieren ligeramente de los de las LLC, y ello es debido a la propia naturaleza de la enfermedad (Tabla II).

TABLA II

Caso	Fijación	<u>Estudio Immunoperoxidásico(%)</u>							IF(%) Rosetas E	
		IgG	IgA	IgM	IgD	IgE	kappa	lambda		
1º J.S.P.	F.A.	0	0	0	0	0	0	0	95	3
	F.C.	0	0	94	0	0	96	0		
2º V.V.M.	F.A.	94	E	6	E	0	97	2	88	8,7
	F.C.	90	E	8	73	E	93	5		

F.A.: formaldehido-acetona; F.C.: formaldehido-calcio.

En efecto, si bien el formaldehido-acetona en el primer caso no permite la distinción de elementos positivos, en el segundo paciente logra resultados cuantitativos similares (a excepción de la cadena pesada de IgD) a los del formaldehido-calcio.

El formaldehido-acetona, en el segundo caso, facilita la distinción entre las CIg y las SIg, especialmente en aquellas formas linfoides con una relación núcleo/citoplasma elevada; además, la perfecta conservación morfológica que proporciona este fijador permite distinguir la positividad localizada en los filopodios.

Por otra parte, el formaldehido-calcio permite identificar claramente en ambos casos la clona inmunológica proliferante, ca

racterizada en el primer paciente por un patrón de SIgM-kappa y en el segundo por CIgG-kappa, mostrando este último la peculiaridad de un 73 por 100 de células positivas para SIgD y también un porcentaje mayoritario de células linfoides con SIgG-kappa. No obstante, este fijador no facilita la observación de la positividad intracitoplásmica en aquellas células B de escaso citoplasma, aunque sí permite identificar la de los filopodios.

Por lo que respecta a la duplicación parcial del método del PAP, se realizó en los linfocitos del primer paciente en cinco ciclos de Ac secundario-complejos PAP que se aplicaron sucesivamente, con los siguientes resultados:

a) Material fijado en formaldehido-acetona: a partir de la primera duplicación comienza a aparecer una tinción de fondo, de distribución irregular, que progresa tras cada ciclo sin que se logre demostrar claramente las Ig linfocitarias.

b) Material fijado en formaldehido-calcio:

1) Método habitual: como indicamos con anterioridad, se obtiene positividad en numerosos linfocitos correspondiente a un patrón monoclonal SIgM-kappa, aunque ocasionalmente algunas células ofrecen un refuerzo periférico compatible con el modelo de tinción de CIg. En los linfocitos más pequeños, con aspecto maduro y bien diferenciado, la tinción se muestra algo más intensa.

2) Primera duplicación parcial del método del PAP: se observa nitidamente la existencia de dos poblaciones celulares, que se caracterizan porque una de ellas está constituida por elementos de mayor tamaño (13-15 micras) que se tiñen con menos intensidad que los de una segunda población integrada por elementos más pequeños (9-10 micras de diámetro)(Figuras 1 y 2).

3) Duplicaciones restantes: a medida que se su

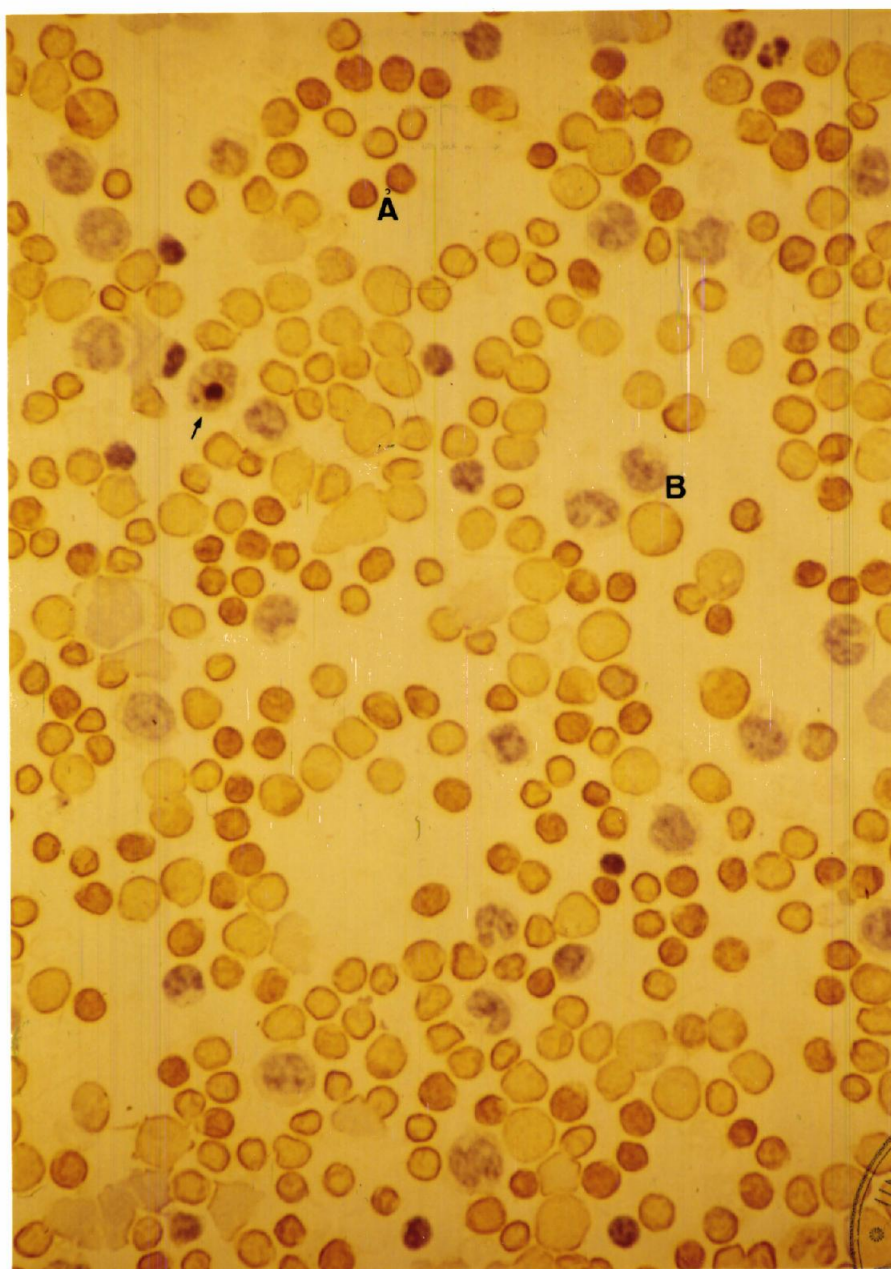


FIGURA 1

Inmunotinción de cadenas pesadas de IgM. Duplicación parcial del método del PAP. Concentrado de linfocitos hemoperiféricos de un paciente diagnosticado de leucemia de células linfosarcomatosas. Se observan dos poblaciones linfoides: una constituida por elementos de tamaño pequeño y de aspecto maduro (A) que se tiñen con mayor intensidad que una segunda población formada por elementos de mayor tamaño y morfológicamente menos diferenciados (B). Se distingue un monocito (M) con un núcleo fagocitado. Fijación: formaldehído-calcio. Contratinción: hematoxilina de Harris. x350.

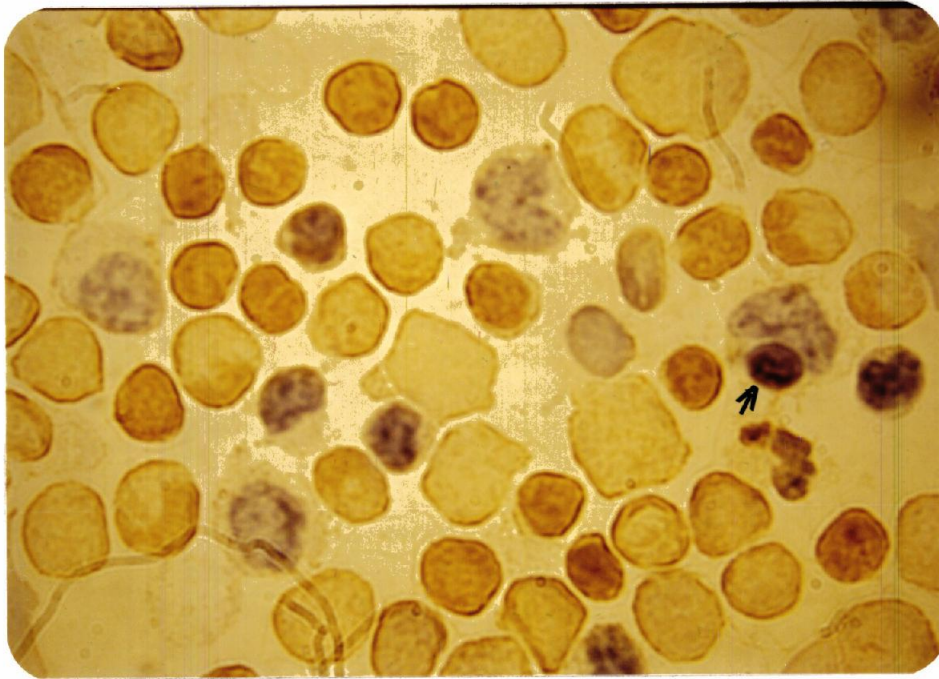


FIGURA 2

Inmunotinción de cadenas ligeras kappa en el mismo paciente de la fi
gura 1. Duplicación parcial del método del PAP. Se demuestra igualmen-
te la presencia de dos poblaciones linfoides inmunocitoquímica y morfo-
logicamente diferentes. Destaca asimismo la existencia de un monocito
con un núcleo (probablemente de un linfocito) fagocitado. Fijación:
formaldehído-calcio. Contratinción: hematoxilina de Harris. xl.000.

ceden los ciclos, se va perdiendo la característica tinción diferencial de las poblaciones referidas, adquiriendo los linfocitos una tonalidad intermedia y uniforme, con ligero aumento de la tinción de fondo que afecta a elementos celulares anteriormente negativos; la morfología nuclear de las células positivas, tras en quinto ciclo, es prácticamente irreconocible.

En cuanto a los granulocitos, mostraron en este paciente una positividad granular débil, que no destacó especialmente tras las duplicaciones (aunque sí hubo un borramiento final de la configuración nuclear), manteniendo la poliespecificidad descrita en las LLC.

Por su parte, los monocitos fueron prácticamente negativos a todas las cadenas inmunoglobulínicas en el método habitual, aumentando ligeramente, y con un patrón poliespecífico de superficie, en los sucesivos ciclos.

SÍNDROME DE SEZARY

Hemos realizado la demostración inmunoperoxidásica de Ig en los linfocitos de la sangre periférica de un enfermo diagnosticado -clínica, citológica y ultraestructuralmente- de síndrome de Sézary, empleando como fijadores el formaldehído-acetona y el formaldehído-calcio.

Los resultados fueron negativos en las extensiones fijadas con formaldehído-acetona, hallándose en forma muy aislada algún linfocito de aspecto maduro positivo para las cadenas ligeras (Clg). En cambio, con formaldehído calcio se demostró un porcentaje superior de cé

lulas positivas (SIg) para ambas cadenas ligeras y para las pesadas de IgG e IgM, aunque siempre en porcentajes inferiores al 1 por 100, tratándose en todos los casos de linfocitos pequeños y morfológicamente bien diferenciados.

LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA (LLA)

Se ha realizado un estudio inmunoperoxidásico de las SIg y CIg en siete enfermos diagnosticados de LLA. Todos ellos, excepto el segundo, fueron examinados previamente a la iniciación del tratamiento específico de la leucemia.

En todos los casos se utilizó el formaldehido-acetona tamponado y, además, en los tres primeros se estudiaron los efectos de la fijación con formaldehido-calcio sobre la antigenicidad de las Ig de los linfocitos de la sangre periférica.

En la Tabla III están expresados los porcentajes de linfocitos positivos y negativos observados en el estudio inmunoperoxidásico, así como los resultados obtenidos por inmunofluorescencia directa con suero polivalente anti-IgG-IgA-IgM y en el test de rosetas E con hematíes de carnero.

Con formaldehido-acetona, se obtuvieron resultados uniformemente negativos en los siete pacientes, distinguiéndose, ocasionalmente, positividad para algunas cadenas inmunoglobulínicas en porcentajes inferiores al 1 por 100; los elementos linfoides identificados como positivos mostraban usualmente un patrón de CIg, y morfológicamente correspondían a elementos maduros con un grado elevado de diferenciación; no se observó positividad franca en ningún linfoblasto.

TABLA III

ESTUDIO INMUNOPEROXIDASICO DE Ig EN LOS LINFOCITOS DE LA SANGRE PERIFERICA DE PACIENTES AFECTADOS DE LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA (LLA).

Caso	Fijación	Estudio inmunoperoxidásico(%)							IF(%)	Rosetas E (%)
		IgG	IgA	IgM	IgD	IgE	kappa	lambda		
1º	F.A.	0	0	0	0	0	0	0	3	91
G.G.G.	F.C.	3	3	7	E	E	12	5		
2º	F.A.	0	0	0	0	0	E	E	28	4
L.D.L.	F.C.	30	19	96	3	E	81	170		
3º	F.A.	0	0	0	0	0	0	0	-	-
A.A.G.	F.C.	E	E	9	3	0	5	1		
4º	F.A.	E	0	0	0	0	E	E	-	-
D.P.M.										
5º	F.A.	14	17	11	0	0	11	9	-	-
J.M.O.										
6º	F.A.	0	0	0	0	0	0	0	-	-
J.Q.O.										
7º	F.A.	0	0	0	0	0	0	0	-	-
J.A.R.										

IF: inmunofluorescencia con suero polivalente anti-IgG-IgA-IgM.

F.A.: formaldehido-acetona.

F.C.: formaldehido-calcio.

E: porcentaje inferior al 1 po 1.000.

No obstante, el quinto caso supuso hasta cierto punto una excepción. Este paciente mostraba en sangre periférica una cantidad de leucocitos superior a medio millon por ml., no existiendo una diferencia sensible entre el aspecto de ésta y el del aspirado de médula ósea, dando el elevado porcentaje de linfoblastos existente. Los resultados de la demostración de Ig fueron similares tambien en la sangre periférica y en el aspirado de médula ósea, con la peculiaridad que se observó un porcentaje, cercano al 4 por 100, de células linfoides con intensa positividad intracitoplásmica a varias cadenas inmunoglobulínicas (Tabla III), y frecuentemente tambien positivas para SIg (Figuras 3, 4, 5 y 6). Estos elementos mostraban una relación núcleo/citoplasma mediana, un tamaño aproximado de 12 micras de diámetro y, en algunos, presencia de uno ó dos nucleolos. A diferencia de estos, existía una numerosa población constituida por grandes linfoblastos constantemente negativos; entre los blastos se distinguían linfocitos de aspecto maduro, igualmente negativos.

Por otra parte, el formaldehido-calcio, ensayado en los tres primeros pacientes, demostró pequeños porcentajes de células positivas para SIg (Tabla III) que no habían sido observados con el primer fijador. Los resultados morfológicos del formaldehido-calcio fueron idénticos a los comentados al estudiar las LLC y LCL.

Finalmente, la duplicación parcial del método del PAP se llevó a cabo en el primer caso, sobre extensiones fijadas en formaldehido-calcio, observandose una positividad ligera y con un patrón de SIg (especialmente para la cadena pesada de IgG y en las dos ligeras) en más del 90 por 100 de los elementos linfoides.

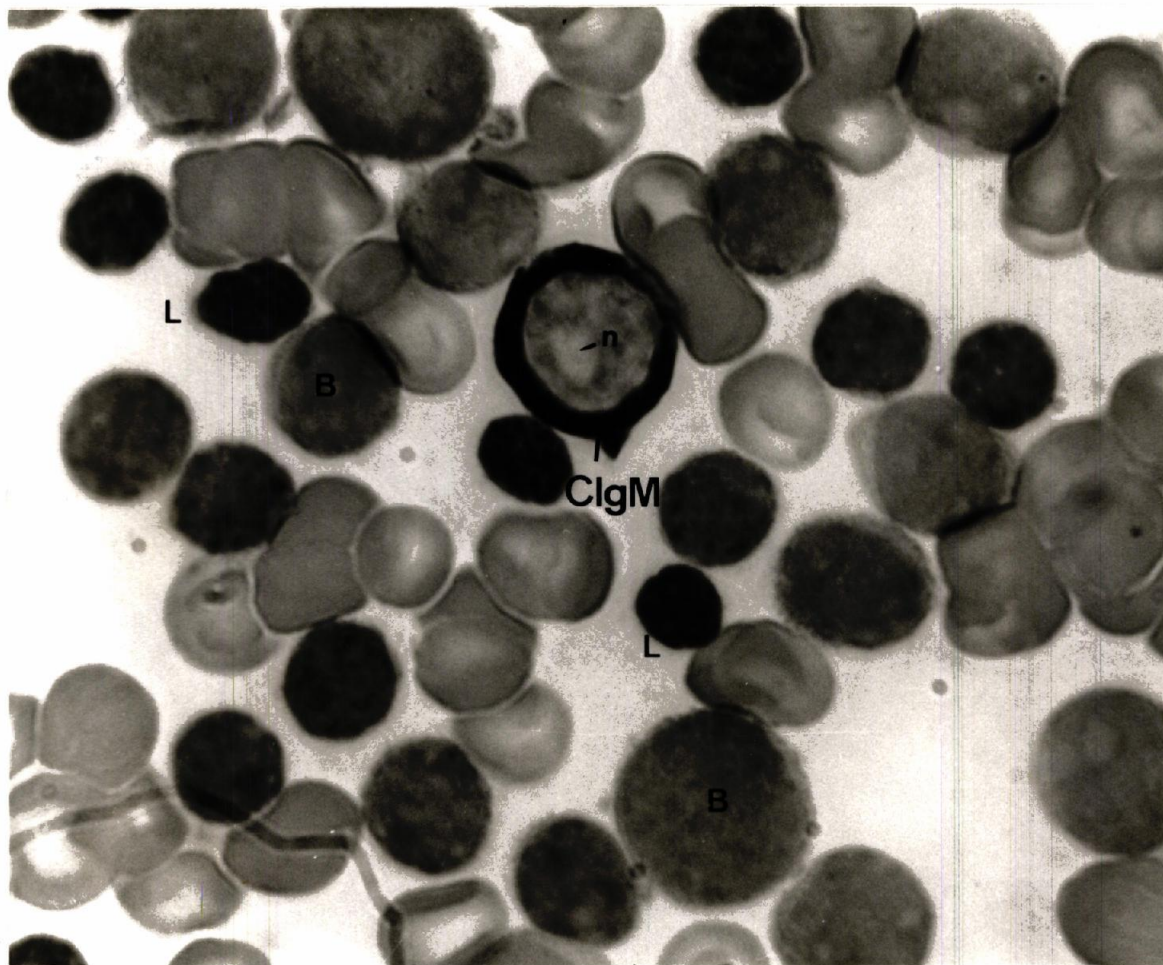


FIGURA 3

Extensión del aspirado de médula ósea de un enfermo diagnosticado de leucemia linfoblástica aguda. Inmunotinción de la cadena pesada de IgM. La población linfoide está formada por elementos de aspecto maduro y bien diferenciados (L) y por células con características blásticas (B). En el centro de la imagen se distingue un linfocito grande con un gran nucleolo (n), destacando una intensa tinción en el citoplasma. Fijación: formaldehído-acetona. Contratinción: hematoxilina de Harris. xl.250.

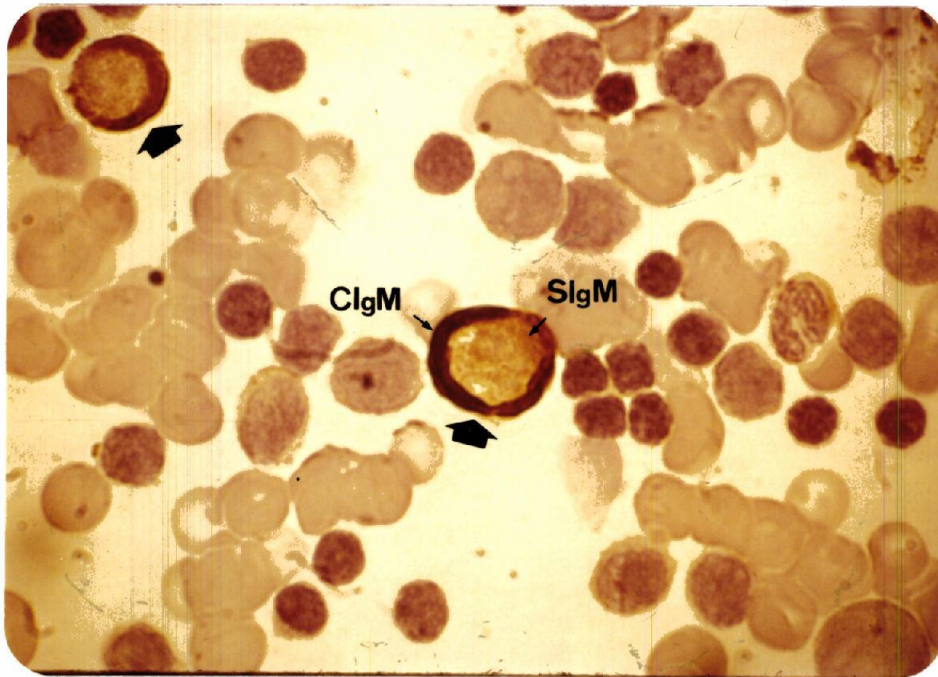


FIGURA 4

Immunotinción de la cadena pesada de IgM. Caso de la figura 3. En las células positivas se observa un patrón de tinción correspondiente a SIgM y a CIgM., en contraste con la negatividad de los restantes elementos celulares. Fijación: formaldehído-acetona. Contratinción: hematoxilina de Harris. xl.000.

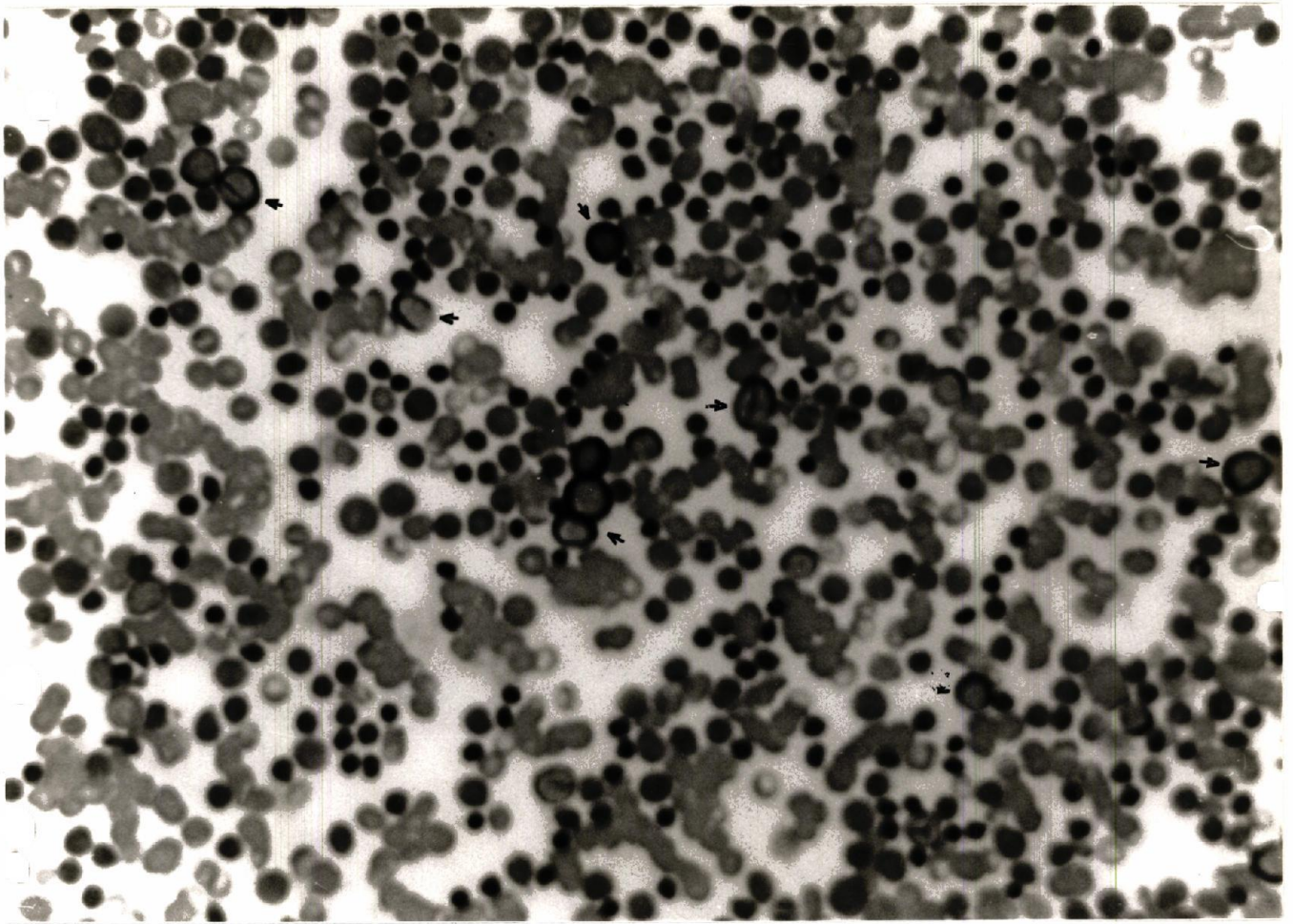


FIGURA 5

Caso de la Figura 3. Vista panorámica. Inmunotinción de la cadena pesa da de IgA. En la imagen se precisa sin dificultad un pequeño porcentaje de células linfoides con un intenso patrón de CIg. Fijación: formaldehí do-acetona. Contratinción: hematoxilina de Harris. x350.

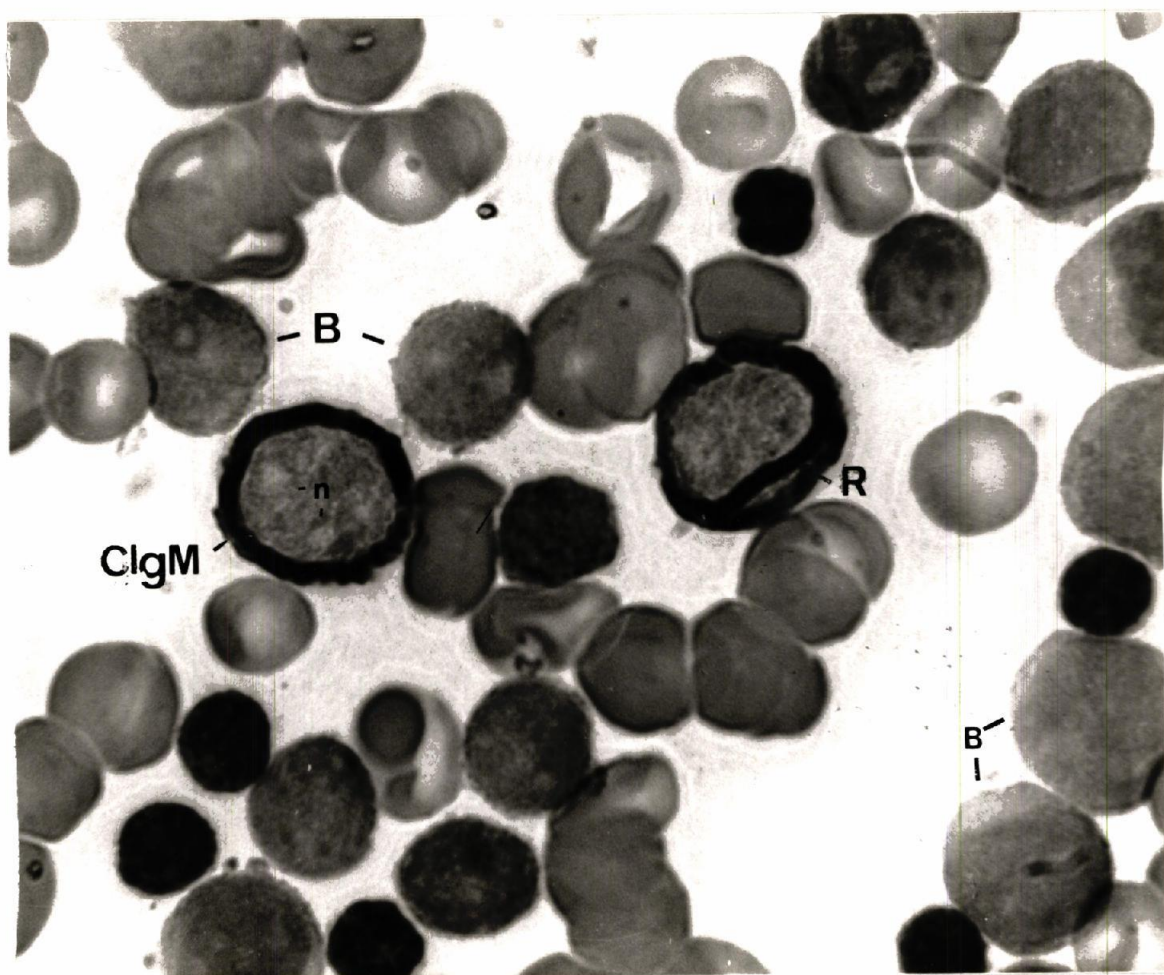


FIGURA 6

Dos linfocitos mostrando un intenso patrón cromático intracitoplásmico para la cadena pesada de IgM. Caso de la Figura 3. En el linfocito positivo situado a la derecha de la imagen aparece un repliegue de la membrana con una marcada tinción. Fijación: formaldehído-acetona. Contratinción: hematoxilina de Harris. xl.250.

GAMMAPATIAS MONOCLONALES (GM)

Hemos llevado a cabo un estudio experimental del método inmunoperoxidásico del PAP sobre extensiones de aspirados de médula ósea de pacientes aquejados de GM, de los cuales 6 estaban diagnosticados de mieloma múltiple, uno de mieloma Bence-Jones y uno de macroglobulinemia de Waldeström. Debemos precisar que, una paciente afectada por un mieloma multiple de tipo IgG-kappa (caso 32), fué diagnosticada simultáneamente de carcinoma de colon. (Tabla IV).

Todos los casos se analizaron en la fase diagnóstica de la hemopatía, previamente al inicio de la terapéutica, excepto el 42 y el 72 que se encontraban en recaída de su enfermedad fundamental tras haber sido sometidos a tratamiento con citostáticos.

En las sucesivas etapas de la técnica se obtuvieron los siguientes resultados:

1) Limpieza de los portaobjetos: no se observó diferencia objetiva entre el lavado en mezcla sulfocrómica, el lavado en metanol y la frotación con lienzo de hilo, sobre los resultados morfológicos e inmunocitoquímicos.

2) Fijación:

a) Vapores de formaldehído: la calidad de la fijación fué variable por debajo de los tres minutos. No obstante, en la generalidad de las pruebas se observaron numerosos pliegues que artefactaban la extensión, especialmente en las zonas más gruesas de la misma, haciendo indistinguibles con frecuencia los tipos celulares. A pesar de ello, la tinción inmunocitoquímica no era interferida, identificándose bastante bien en los plasmocitos malignos.

b) Metanol puro: siendo usualmente el alcohol

TABLA IV

ESTUDIO INMUNOPEROXIDASICO DE Ig EN ASPIRADOS DE MEDULA OSEA DE PACIENTES CON GAMMAPATIAS MONOCLONALES MALIGNAS, CON REFERENCIA A LOS PORCENTAJES DE CELULAS MIELOMATOSAS CON TINCION DE SUPERFICIE (S) E INTRACITOPLASMICA (C)

CASO	FRACCION M SERICA	ESTUDIO INMUNOPEROXIDASICO (%)													
		IgG		IgA		IgM		IgD		IgE		kappa		lambda	
		C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
1º P.G.R.	IgGkappa	17	10	7	4	3	32	1	13	0	5	22	7	10	19
2º G.P.O.	IgGkappa	38	17	6	13	0	5	E	E	0	0	29	21	20	15
3º R.G.S.	IgGkappa	32	8	9	3	4	14	0	E	0	0	27	15	16	10
4º A.S.	IgAlambda	2	E	43	32	0	0	0	0	0	0	E	E	52	36
5º J.M.M.	IgAlambda	4	12	18	10	0	0	0	0	0	0	6	2	40	26
6º J.A.	IgAlambda	3	1	42	2	0	0	0	0	0	0	7	11	48	23
7º C.J.	Lambda	E	E	0	0	0	0	0	0	0	0	E	E	6	72
8º F.M.S.	IgMkappa	E	E	E	2	1	12	0	E	0	E	3	14	E	4

S: patrón tintorial de superficie.

C: patrón tintorial de citoplasma, asociado o no al de superficie.

metílico un excelente fijador de la citología sanguínea, en este caso, tras la contratinción final la distribución y configuración de la cromatina nuclear se tornan difusas y pierden su nitidez. La tinción inmunocitoquímica se conserva.

c) Solución de formaldehído al 10 por 100 en alcohol etílico: mejor conservación del material celular que la lograda sólo con metanol, aunque sin obtenerse una nitidez total. La tinción inmunoperoxidásica de las Ig fué ligeramente más débil, siendo más prolongado el tiempo de revelado necesario para conseguir una coloración suficiente.

d) Solución de formaldehído al 50 por 100 en alcohol etílico: resultados similares a los del fijador del apartado c).

e) Solución de formaldehído tamponada: la fijación de los hematíes es deficiente, perdiéndose en las zonas gruesas de la extensión; en el resto se encuentran muy aisladamente, a veces parcialmente destruidos, y por los bordes finos de la extensión conservan su morfología normal. Este fenómeno ocurre parcialmente en los citoplasmas de las células nucleadas, que suelen encontrarse con amplias zonas de extracción. La tinción inmunocitoquímica parece que no es interferida por la propia fijación, aunque si se afecta por la pérdida de material celular. El resultado final, tras la contratinción, es muy pobre.

f) Solución de formaldehído-acetona tamponada: el resultado morfológico es excelente. Se distingue claramente la inmunotinción en las células mielomatosas.

g) Metanol/peróxido de hidrógeno: resultados similares a los obtenidos con metanol puro. Aporta la ventaja adicional de inhibir la actividad peroxidásica endógena de la extensión.

h) Solución de acetona al 60%, en frío: se obtienen resultados morfológicos e inmunocitoquímicos parecidos a los del formaldehído-acetona tamponado.

i) Solución de formaldehído-calcio: la fijación de los hematíes es deficiente, observándose un ligero componente de extracción en los citoplasmas de las células nucleadas. En este sentido podría considerarse como una versión muy mejorada de la solución tamponada de formaldehído. El resultado de la inmunotinción se ha valorado como positivo, si bien el tiempo de revelado es dos o tres veces más prolongado que el necesario tras la fijación con formaldehído-acetona. Dado que la calidad morfológica que proporciona es irregular, se consideró a este fijador inadecuado para los aspirados de médula ósea.

3) Inhibición de la actividad peroxidásica endógena:

No se logró con la incubación a 80°C; tanto la actividad peroxidásica de los granulocitos como la pseudoperoxidásica de los hematíes se manifestaron intensamente a los diez minutos de exposición a la solución reveladora.

Con la solución de fenilhidrazina, la inhibición fué manifiesta aunque no absoluta. Además, tras la incubación en dicha solución, la extensión adquiría una coloración tenue amarillenta que afectaba a la celularidad y al fondo. Como es propio de este método, se observó como la actividad peroxidásica de los granulocitos eosinófilos permanecía intacta.

Con metanol/peróxido de hidrógeno, las pruebas cronológicas que se realizaron demostraron una inhibición gradual de la actividad peroxidásica endógena, que era total a los cinco minutos en los granulocitos neutrófilos, a los quince en los eosinófilos y a los veinte en los eritrocitos; esta permanencia es ya suficiente considerando

un tiempo de 30 minutos de revelado; no se observaron modificaciones prolongando la incubación hasta 60 minutos.

4) Contratinción:

a) Hematoxilina de Harris ~~de Harris~~: el contraste ofrecido con la tinción de la DAB es óptimo. Sin embargo, los eosinófilos pueden pasar desapercibidos al no matizarse su granulación en comparación con la de los neutrófilos. Para el viraje de la hematoxilina hacia el color azul, la solución de amoníaco al 1/500 actúa en unos segundos, si bien la prolongación del baño de la extensión puede ocasionar desprendimientos de la misma. Alternativamente, el agua corriente y la solución de carbonato de litio proporcionaron resultados equivalentes tras un baño de unos 30 segundos aproximadamente.

b) Giemsa: proporciona una coloración amarillenta a la granulación de los eosinófilos, y manifiesta optimamente la configuración nuclear. Por otra parte, aporta una tinción basófila al citoplasma que, cuando se prolonga la tinción durante más de 2 o 3 minutos, interfiere con la coloración de la DAB dando así un color verdoso oscuro con un contraste muy pobre.

c) May-Grünwald: la granulación del eosinófilo se torna rojiza. La cromatina nuclear adquiere una tonalidad celeste débil que hace resaltar escasamente sus detalles más finos. Cuando la tinción se prolonga por encima de cinco minutos, comienza a interferir ligeramente con el color de la DAB.

d) Giemsa-hematoxilina de Harris: morfológicamente los resultados son positivos, contrastando con el cromatismo de la DAB.

e) May-Grünwald-hematoxilina de Harris: la coloración general es más viva en comparación con la asociación Giemsa-hematoxilina. La DAB resalta con gran nitidez.

La prolongación del tiempo de revelado con DAB se observó que interfiere progresivamente con la contratinción, obligando a prolongar esta última en lo que corresponde a la hematoxilina de Harris y no a los derivados del Romanovsky, ya que estos últimos, como indicamos más arriba, afectan a la coloración amarillo-marrón de la DAB.

5) Diluciones de los anticuerpos:

a) Ac primario: en general, todos los Ac anti-Ig dieron resultados positivos a todas las diluciones, excepto la de 1/1.600 utilizada para las cadenas pesadas de IgG, IgA e IgM. No hubo aumento objetivable de la tinción de fondo al aumentar la concentración de ~~de~~ Ac, ni siquiera a 1/20. Con respecto a las cadenas pesadas de IgD e IgE, se experimentaron en los casos 1º y 2º (Tabla IV), obteniendo resultados positivos tan sólo en el primero, en el que se valoraron las diluciones.

b) Ac secundario: los resultados fueron positivos a las diluciones empleadas, sin diferencias sensibles en las pruebas cronológicas, es decir la positividad obtenida no se modificó variando el tiempo de incubación entre quince y sesenta minutos.

c) Complejos solubles PAP: los resultados son superponibles totalmente a los obtenidos con el Ac secundario.

6) Antigüedad de las extensiones: el material fijado, se almacenó a 4º-6º C hasta su utilización. Los resultados fueron uniformes en los diez primeros días. Con posterioridad se observaron irregularidades en la tinción, que oscilaban entre la necesidad de prolongar

el tiempo de revelado y la negatividad parcial o total a la tinción.

De los seis casos de mieloma múltiple estudiados, el patrón immunoelectroforético era de IgG-kappa en los tres primeros e IgA lambda en los tres siguientes. Su estudio immunoperoxidásico de Ig puso de relieve porcentajes de células linfoides (incluidos linfocitos con un grado avanzado de transformación, y células mielomatosas) positivas para SIg y CIg que están expresados en la Tabla IV, al igual que los del mieloma Bence-Jones y de los del enfermo con la macroglobulinemia de Waldenström.

En los seis mielomas múltiples, las cadenas immunoglobulínicas predominantes en el suero se correlacionaban bastante bien con el patrón immunocitoquímico de las células mielomatosas, observándose que, en las formas proplasmocíticas y plasmoblásticas solía existir una marcada positividad para CIg (Figura 7), más débil en la región centrosómica, con refuerzo periférico; en la generalidad de las mismas no se observaba SIg. Por contra, en las células de aspecto más diferenciado, es decir aquellas que se podrían considerar como típicas células plasmáticas maduras, la immunotinción brillaba por su ausencia o bien constituía una leve coloración con frecuencia difícil de objetivar.

En ocasiones, alrededor de los plasmocitos positivos se distinguía un halo de positividad (Figura 8), que se interpretó como un fenómeno de difusión de las Ig, desde el interior de la célula al espacio extracelular, ocurrido previamente a la fijación.

En el caso del mieloma Bence-Jones, serologicamente de tipo lambda, se demostró un 78 por 100 de células mielomatosas positivas para la cadena ligera lambda, de las cuales el 72 por 100 sólo poseían SIg, sin que aparentemente existiera diferencia morfológica entre las mismas.

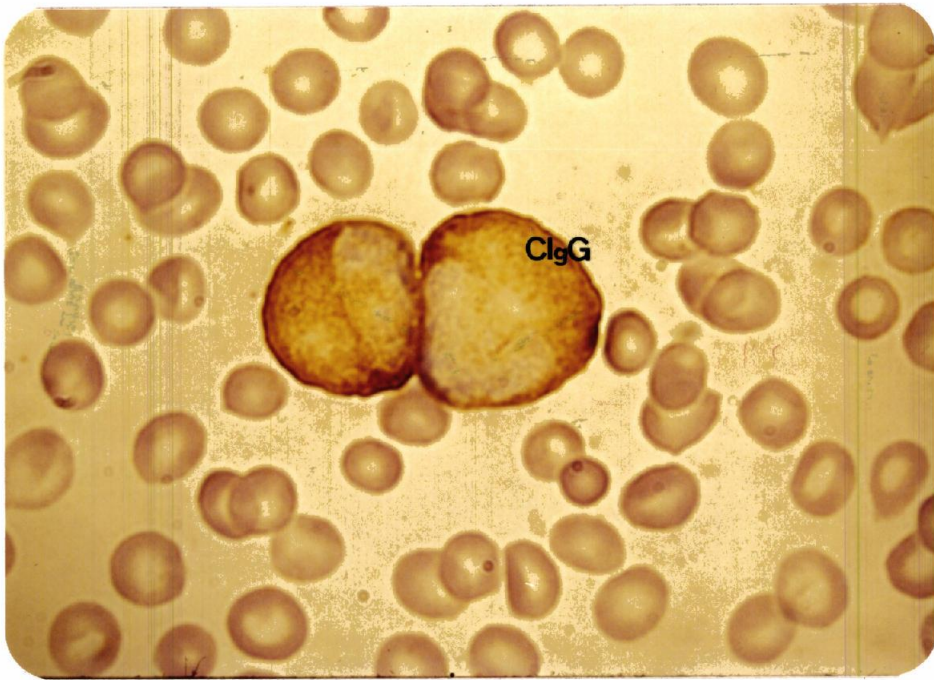


FIGURA 7

Dos células mielomatosas procedentes del aspirado de médula ósea de un paciente con una discrasia plasmocelular maligna de tipo IgG-kappa. Immunotinción de la cadena pesada de IgG, con un característico patrón tintorial intracitoplásmico, más débil en la región centrosómica y con refuerzo periférico. Fijación: formaldehído-acetona. Contratinción: May-Grünwald-hematoxilina de Harris. xl.000.

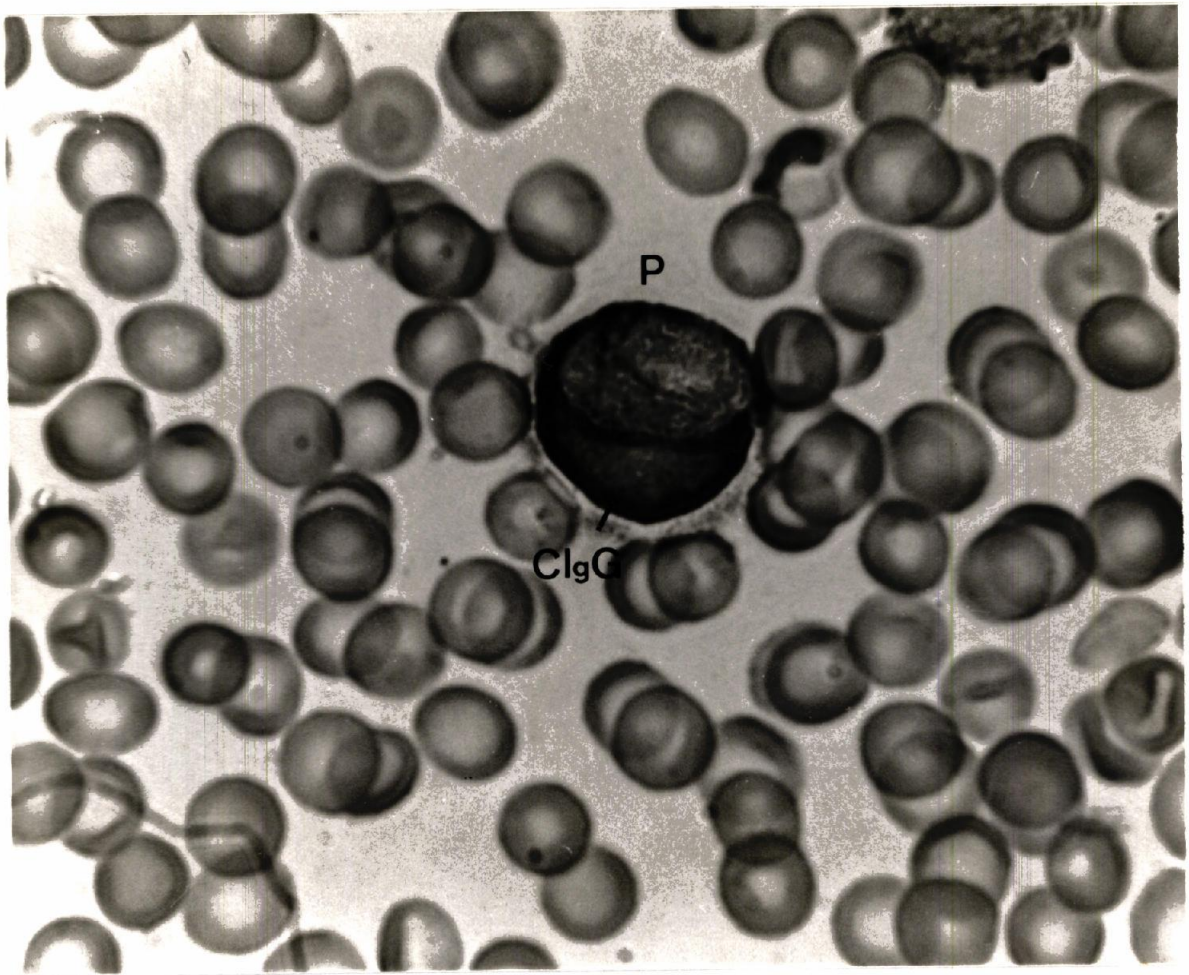


FIGURA 8

Célula mielomatosa del mismo paciente de la Figura 7. Immunotinción de la cadena pesada de IgG. Alrededor del plasmoblasto (P) se observa un ligero halo que corresponde a IgG difundida desde el interior de la célula. Fijación: formaldehído-acetona. Contratinción: May-Grünwald-hematoxilina de Harris. xl.250.

Finalmente, en el enfermo con macroglobulinemia de Waldeström, la inmunotinción del aspirado de médula ósea demostró un 13 por 100 de elementos positivos para la cadena pesada de IgM, y un 17 por 100 para la cadena ligera kappa, casi todos con positividad exclusiva para SIg, y con un patrón morfológico escasamente diferenciado en sentido plasmocitoide (Figura 9). Para otras cadenas inmunoglobulínicas los porcentajes de células positivas eran muy inferiores (Tabla IV), correspondiendo habitualmente a formas linfoplasmocitoides y a células plasmáticas (Figura 10).

En todos los casos comentados, se observó frecuentemente en los granulocitos, maduros e inmaduros, la presencia de positividad intracitoplásmica de tipo granular, especialmente para aquellas cadenas inmunoglobulínicas que caracterizaban el pico M de la inmunoelectroforesis; este hecho se interpretó como consecuencia de la existencia de complejos inmunes fagocitados o absorbidos por la célula granulocítica.

DEMOSTRACION DE LISOZIMA

La existencia de esta enzima se utilizó como marcador de exclusión de la serie linfoide. La lisozima fué demostrada en aspirados de médula ósea fijados en formaldehido-acetona tamponado de dos pacientes con mieloma (casos 32 y 72) y de dos sujetos diagnosticados de leucemia mieloide crónica (LMC). En todos los casos examinados, desde los linfocitos maduros a las células plasmáticas más diferenciadas, pasando por las células mielomatosas, todos fueron negativos a la inmunotinción. Por contra se demostró una positividad granular en la estirpe granulocítica, por lo general más intensa en las formas más primitivas (Figura 11).

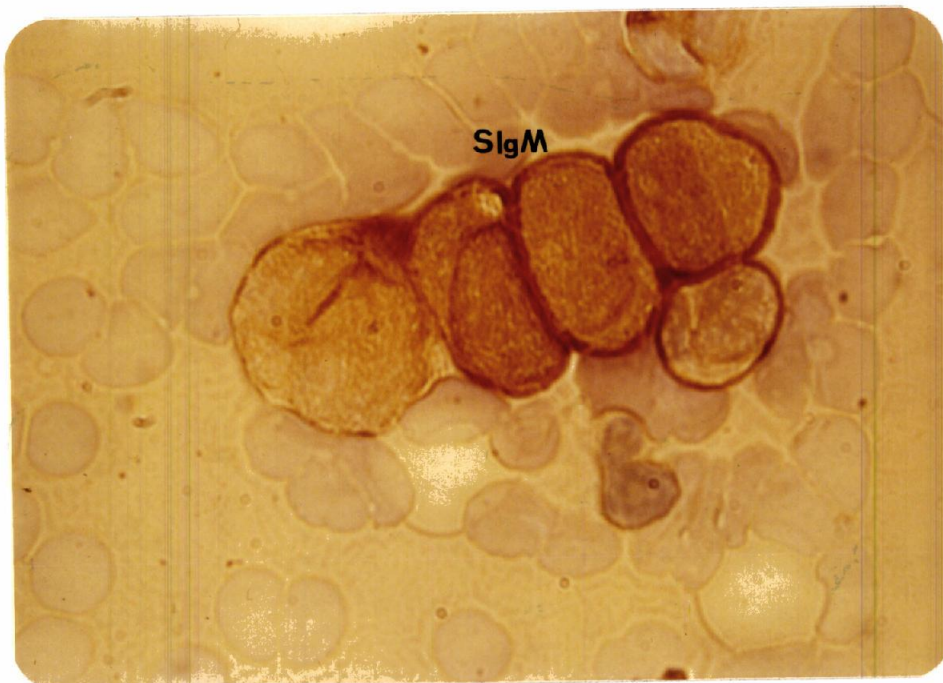


FIGURA 9

Immunotinción de la cadena pesada de IgM. Elementos linfoides de gran tamaño observados en el aspirado de la médula ósea de un paciente diagnosticado de macroglobulinemia de Waldeström, en los que se distingue un típico patrón tintorial de superficie. Fijación: formaldehído-acetona. Contratinción: hematoxilina de Harris. x1.000.

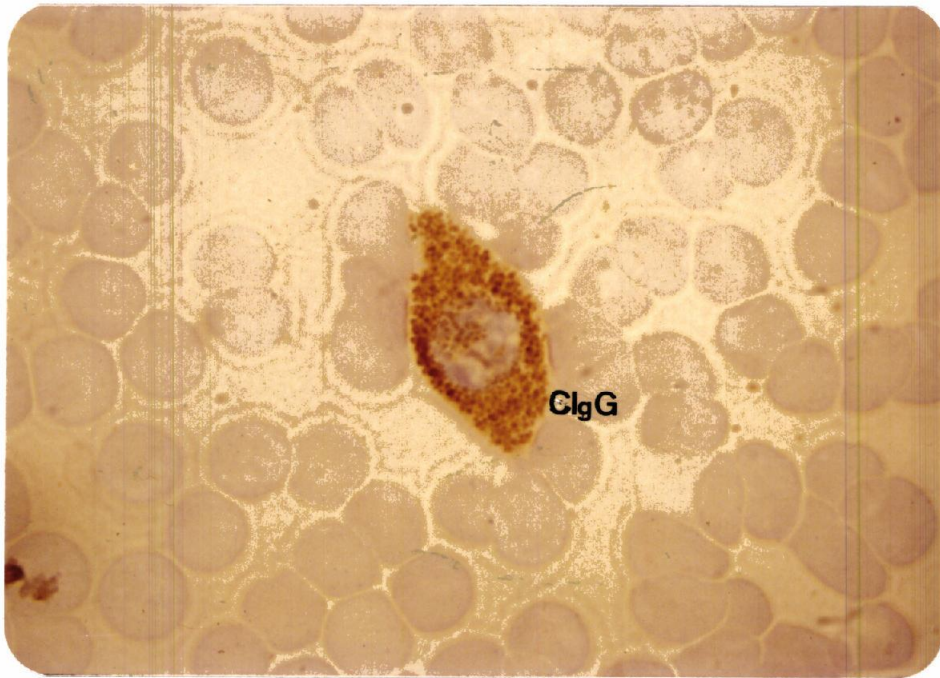


FIGURA 10

Plasmocito del mismo paciente de la Figura 9 con positividad granular intracitoplásmica para la cadena pesada de IgG. La morfología no es la típica de una célula plasmática normal, situándose el núcleo aproximadamente en posición central, y parcialmente cubierto por la granulación. Fijación: formaldehído-acetona. Contratinción: hematoxilina de Harris. x1.000.

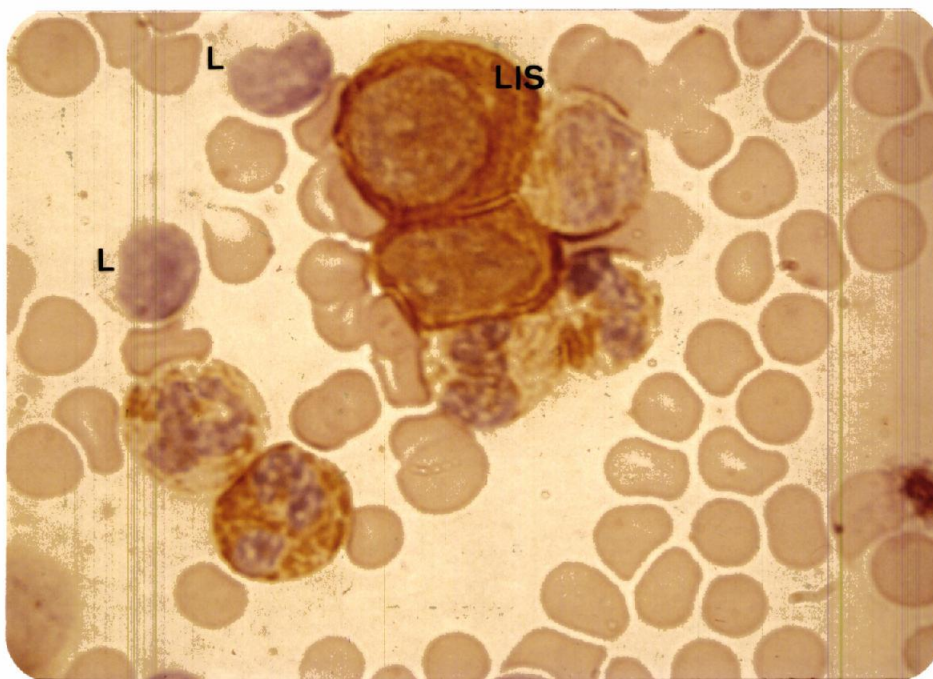


FIGURA 11

Inmunotinción de lisozima (muramidasa). Aspirado de médula ósea de un paciente diagnosticado de leucemia mieloide crónica. Se observan elementos de la serie granulocítica en diferentes estadios de maduración. La tinción es más intensa en las formas más primitivas, aunque se distingue un polinuclear con un patrón cromático anormalmente elevado. Los linfocitos (L) son constantemente negativos. Fijación: formaldehído-acetona. Contratinción: hematoxilina de Harris. xl.000.

PLASMOCITOSIS REACTIVA

Se demostró la existencia de Ig en la celularidad de los aspirados de médula ósea, fijados en formaldehído-acetona taponado, de dos pacientes con plasmocitosis reactiva. El primero mostraba como enfermedad fundamental una anemia refractaria, encontrándose en el aspirado un 4 por 100 de formas linfoplasmocitoides; el proteinograma y la cuantificación de Ig séricas se hallaban dentro de los límites de la normalidad. Incluimos dentro de la plasmocitosis un elevado porcentaje de formas inmunoblásticas (con frecuencia con uno o dos nucleólos) que pudieron ser catalogadas sin dificultad con el método inmunoperoxidásico, evidenciándose el hecho de que, al progresar la diferenciación hacia la célula plasmática, disminuía visiblemente la intensidad de la tinción propia de SIg hasta desaparecer. En el subsiguiente recuento, se obtuvieron los siguientes resultados:

IgG	40%
IgA	9%
IgM	2%
IgD	Inferior al 1%
IgE	No se ven
kappa	27%
lambda	7%

En este caso, se demostró una positividad relativamente importante en los granulocitos (especialmente en las formas más maduras) principalmente para la cadena pesada de IgG y para las dos ligeras, constituida por una tinción granular irregularmente distribuida por el protoplasma.

El segundo caso evaluado era el de un enfermo diagnosticado de gammapatía sérica benigna, con una tasa sérica de IgG de 1837 mg%; en el aspirado de médula ósea se encontró una plasmocitosis

del 5 por 100, en la que el estudio inmunoperoxidásico de Ig proporcionó los resultados siguientes:

IgG	35%
IgA	18%
IgM	7%
IgD	No se ven
IgE	Menos del 1%
kappa	17%
lambda	22%

El examen de los granulocitos fué similar al del caso anterior.

En ambos, las series roja y megacariocítica fueron constantemente negativas, aunque en algunas plaquetas se demostró positividad para las cadenas pesadas de IgG e IgA, y para las dos ligeras.

LINFOMAS

Dos han sido los casos estudiados, el primero a través del aspirado de médula ósea, y el segundo por medio de la suspensión celular obtenida de una adenopatía maligna biopsiada.

El primer paciente estaba diagnosticado de linfoma de células convolutas, y en su aspirado de médula ósea se observaba un porcentaje de células con características blásticas inferior al 4 por 100. En el estudio inmunoperoxidásico tales células fueron negativas a la inmunotinción de Ig, tiñendose en cambio células linfoides morfológicamente normales, aunque la mayoría con rasgos plasmocitoides. Los resultados obtenidos fueron:

IgG	59%
IgA	10%
IgM	14%
IgD	Menos del 1%
IgE	" "
kappa	30%
lambda	17%

En el segundo caso valorado, el método inmunoperoxidásico se desarrolló en extensiones de una suspensión celular obtenida de un ganglio linfomatoso, valorandose los efectos de la fijación con formaldehido-acetona y formaldehido-calcio sobre la antigenicidad de las Ig con los siguientes resultados:

Fijación	Estudio inmunoperoxidásico (%)							IF(%)	Rosetas E(%)
	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE	kappa	lambda		
F-A	0	0	0	0	0	0	0	15	59
F-C	E	E	5	3	E	2	2		

Hemos de indicar que las extensiones se realizaron y estudiaron a las 48 horas de la obtención de la suspensión celular, por lo que la morfología de las células se hallaba ligeramente afectada. Por otra parte, en este paciente se realizaron estudios de inmunofluorescencia directa con suero poliespecífico anti-IgG, IgA e IgM, y test de rosetas espontáneas con hematies de carnero, con los resultados ya expresados (estos estudios se practicaron en la suspensión celular recién obtenida).

DONANTES DE SANGRE SANOS

Se estudiaron las Ig de los linfocitos de la sangre periférica por el método inmunoperoxidásico del PAP, ensayandose los efectos de la fijación con formaldehido-acetona y formaldehido-calcio.

Con el formaldehido-calcio se pusieron de relieve porcentajes variables de linfocitos positivos, con un modelo tintorial propio de SIg. En cambio, con formaldehido-acetona se obtuvieron porcen

tajes de células positivas inferiores al 1 por 100 en todos los casos:

Caso	Fijación	Estudio inmunoperoxidásico (%)						
		IgG	IgA	IgM	IgD	IgE	kappa	lambda
1º	F-A	E	0	0	0	0	E	0
	F-C	2	2	5	4	E	5	2
2º	F-A	E	0	0	0	0	E	0
	F-C	2	3	6	2	1	6	7

Con formaldehído-acetona la positividad demostrada solía corresponder generalmente a CIg, aunque algunos linfocitos parecían mostrar cierta débil positividad al mover el micrométrico del microscopio; no fueron valorados al no ser claramente objetivables.

De otra parte, observamos positividad poliespecífica en los granulocitos presentes (granular) y en algunos monocitos (escasa y con un patrón de SIg), siendo mejor el resultado morfológico en las extensiones fijadas con la solución tamponada de formaldehído-acetona, a igualdad de resultados en la inmunotinción con ambos fijadores.

DISCUSION

LEUCEMIA LINFOIDE CRONICA (LLC)

La evaluación de los resultados obtenidos del estudio inmunológico de once casos de LLC mediante el método inmunoperoxidásico del PAP, adaptado a extensiones de concentrados de linfocitos de la sangre periférica, hace resaltar la importancia de la fijación sobre la antigenicidad de las Ig y, por tanto, sobre los resultados del método inmunocitoquímico.

En efecto, el examen detenido de la casuística aportada demuestra desde el principio la superioridad de los resultados obtenidos con la fijación en formaldehido-calcio, superioridad que traduce una conservación mejor de la antigenicidad de las Ig celulares con respecto a los fijadores conocidos.

En los once pacientes examinados, ensayamos los efectos de la fijación con una solución tamponada de formaldehido-acetona (según Mason y cols, 1975)(73); además, en siete de ellos realizamos paralelamente una evaluación comparativa con formaldehido-calcio de Baker.

Con la solución tamponada de formaldehído-acetona, los porcentajes de células positivas fueron inferiores al 1 por 100 en diez de los pacientes (Tabla I); tan sólo el noveno supuso una excepción que más adelante comentaremos. También señalaremos que en el séptimo se identificaron inclusiones cristalinas en linfocitos aislados, que, a veces, llegaban a medir 6 y 7 micras de longitud; algunos linfocitos mostraban hasta tres inclusiones; se distinguían nitidamente en el citoplasma o bien aparecían parcial o totalmente sobre el núcleo.

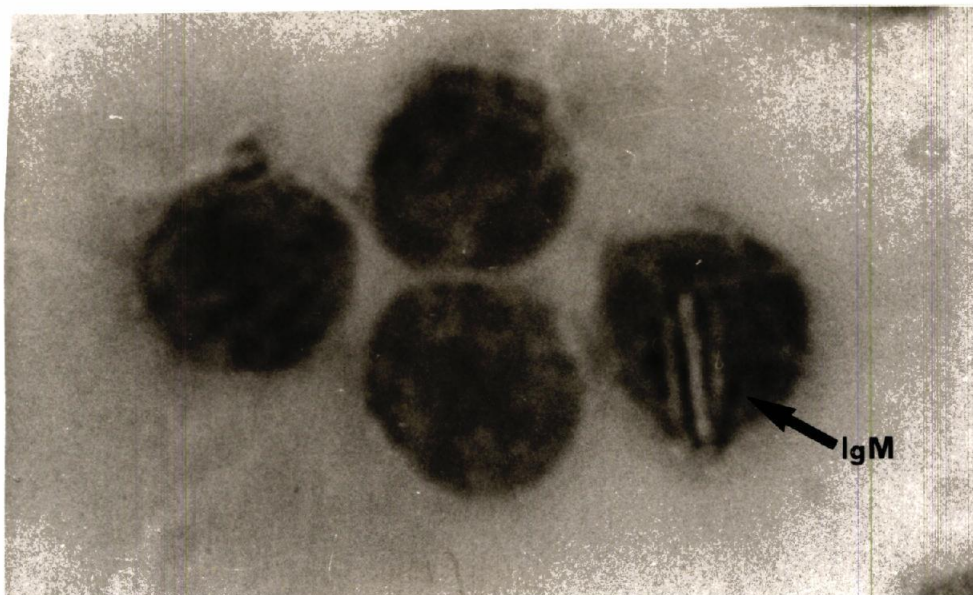
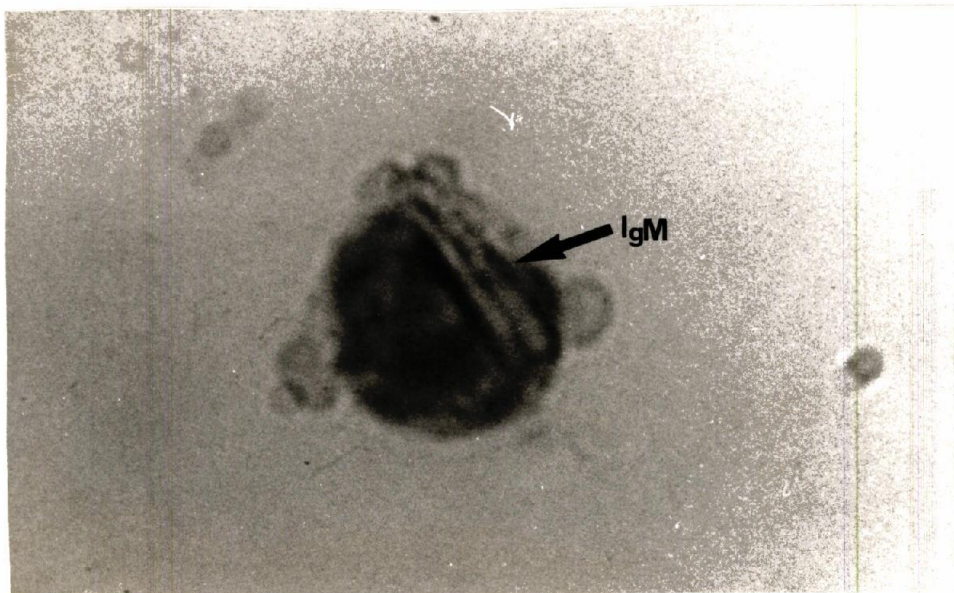
Los referidos resultados se correlacionan bastante bien con las recientes aportaciones de Mason y cols. (75). Dichos autores, empleando como fijador el formaldehído-acetona tamponado, realizaron un estudio inmunoperoxidásico -con el método del PAP- sobre extensiones de linfocitos de la sangre periférica de 28 pacientes diagnosticados de LLC; paralelamente realizaron una técnica de inmunofluorescencia como testigo. En su estudio, observaron en 23 pacientes resultados negativos, en tres un patrón monoclonal de SIg, y en los dos restantes inclusiones cristalinas intarcitoplásmicas (IgM-kappa e IgM-lambda) similares a las anteriormente mencionadas, y que fueron demostradas a ultraestructura, apareciendo en un porcentaje de linfocitos no especificado por los autores. Así, llegaron a la conclusión de que el método inmunoperoxidásico llevado a cabo sobre extensiones de linfocitos de LLC-B, fijados en solución amortiguada de formaldehído-acetona, es superior a la inmunofluorescencia en cuanto a los resultados citomorfológicos finales, aunque inferior a dicho método en sensibilidad.

Tales resultados son deficientes desde el punto de vista de que el objetivo primordial de un método inmunocitoquímico no es sólo obtener una buena conservación de la morfología celular, sino demostrar las clases de Ig presentes en los linfocitos.

Como anteriormente señalábamos, los resultados que obtuvimos tras la fijación en formaldehido-acetona guardan un gran paralelismo con los de Mason y cols. (75), e incluso llegamos a observar la existencia de inclusiones cristalinas de tipo IgM-lambda en uno de ellos.

La presencia de inclusiones cristalinas de Ig ha sido observada en numerosas ocasiones por diversos autores, siendo demostradas por inmunofluorescencia, si bien con este método la morfología de las mismas se pierde prácticamente. Por tal razón, Mason y cols., en los dos casos en que las demuestran por el método del PAP, destacan la importancia morfológica del hallazgo y su posterior conservación tras el marcaje. En nuestro caso, suscribimos las conclusiones de dichos autores, y además resaltamos el hecho de que se trataba de inclusiones cristalinas de tipo IgM-lambda, inmunoglobulina que se asocia con relativa frecuencia a la LLC. (Figuras 12 y 13).

De otra parte, en el noveno caso, el estudio inmunoperoxidásico del material fijado en formaldehido-acetona dió como resultado un 40 por 100 de linfocitos positivos para la cadena pesada de IgG, y un 17 por 100 para la cadena ligera kappa, ambas con un patrón típico de CIg. Es notable la presencia de CIg en una LLC. Pangalis y cols. (90) en un estudio inmunohistoquímico por el método del PAP en ganglios linfáticos de 65 pacientes diagnosticados de LLC, tan sólo en tres llegan a demostrar la existencia de CIg monoclonal en los linfocitos. En nuestro caso, además de las cadenas antes referidas, existía otras que se teñían en menor cuantía, y con un patrón propio de SIg. Así pues, consideramos que el paciente estaba afectado por una LLC de tipo IgG-kappa, y que la desproporción existente entre los porcentajes de células positivas para la cadena ligera y la pesada obedece a alteraciones inducidas por la fi



FIGURAS 12 y 13

Linfocitos de la sangre periférica de un paciente con una leucemia linfocítica crónica. Inmunotinción de la cadena pesada de IgM. En la imagen superior se observa un linfocito con dos inclusiones cristalinas de IgM, paralelas, que miden aproximadamente $9 \times 0,6$ micras. En la imagen inferior, el mismo tipo de inclusiones aparecen en el linfocito de la derecha. Fijación: formaldehído-acetona. Contratinción: hematoxilina de Harris. $\times 3.250$.

jación, o bien a una peculiaridad de la propia proliferación linfoide.

En consecuencia, pensamos que los resultados obtenidos con la solución tamponada de formaldehido-acetona no son satisfactorios desde el momento que este fijador afecta de forma clara a la sensibilidad del método inmunoperoxidásico. Por tal motivo, iniciamos en siete pacientes un estudio paralelo con formaldehido-calcio como fijador.

El formaldehido-calcio de Baker había sido utilizado por primera vez en el método inmunoperoxidásico en 1980 por REITAMO y cols. (104) sobre extensiones de linfocitos de la sangre periférica de individuos normales, expuestos en un medio de cultivo durante seis días y estimulados con mitógenos, en los que demostraron Ig, de superficie e intracitoplásmica. Estos autores observaron una mejora de la sensibilidad con este fijador con respecto al formaldehido-acetona, y también sobre la inmunofluorescencia, indicando asimismo la deficiente fijación que proporciona en las extensiones de los aspirados de médula ósea.

Partiendo de dicha experiencia, aplicamos este fijador en extensiones de concentrados linfocitarios de la sangre periférica de pacientes con LLC. Los resultados, expresados en la Tabla I, son comparativamente superiores a los obtenidos con el formaldehido-acetona, tanto que con éste en los siete casos son negativos o expresan porcentajes de linfocitos positivos inferiores al 1 por 100, en tanto que con el formaldehido-calcio se logra determinar la clona inmunológica proliferante en seis y se obtiene un resultado valorable en el que resta.

En efecto, con formaldehido-calcio se puso de relieve claramente la existencia de cuatro casos de proliferación de la clase IgM

(dos de tipo kappa y dos de tipo lambda), dos de la clase IgG (ambas de cadena ligera kappa) y una probable proliferacion monoclonal IgA-lambda.

El elevado porcentaje de proliferaciones de tipo IgM obtenido, se halla en concordancia con los resultados de Preud'homme y cols. (100, 101) que, mediante inmunofluorescencia directa, describen la existencia de 27 casos de proliferacion monoclonal IgM entre 73 enfermos diagnosticados de LLC.

Algunos de los pacientes estudiados mostraron algunas particularidades en sus resultados, entre las que merecendestacarse las observaciones realizadas en el cuarto paciente (Tabla I). Se trataba de un varon adulto afectado por una LLC de varios años de evolución con tratamiento específico, que en el momento del estudio poseía unas tasas séricas elevadas de IgG (1800-2000 mg%) y de IgA (700-800 mg%). El estudio inmunoperoxidásico puso de relieve la existencia de positividad de superficie para las cadenas pesadas de IgG e IgA y para las dos ligeras, todas ellas en proporciones superiores al 90 por 100 de los linfocitos. El caso, trás ser evaluado globalmente, fué considerado como una proliferación monoclonal de tipo IgG-kappa. Para llegar a tal conclusión, valoramos los hechos siguientes:

19) En el enfermo, las tasas séricas de IgG e IgA estaban elevadas por encima de los valores considerados como normales en el laboratorio que las determinó. Por lo tanto creemos posible que uno de los dos anticuerpos citados se encontrase absorbido sobre la superficie de los linfocitos leucémicos, es decir que fuera extrínseco, en tanto que el otro sería sintetizado por las propias células.

2a) En conexión con el anterior apartado está el hecho de que en el procedimiento de elaboración del concentrado linfocita-

rio figura un periodo de incubación a 37°C, con la finalidad de desprender la mayoría de las IgG extrínsecas (citofílicas) absorbidas sobre la superficie del linfocito, según el método de Lobo y cols. (66).

39) En el proceso de revelado con la DAB, se advirtió que la dinámica de la tinción fué más rápida e intensa para las cadenas gamma y kappa (estabilización media de la tinción a los dos minutos) que la lograda con las cadenas alfa y lambda (estabilización media a los diez minutos).

40) Estadísticamente, la LLC de tipo IgA es muy rara. Preud'homme y cols (100), por inmunofluorescencia directa, demuestran un caso entre 73 pacientes con LLC estudiados.

Tales razonamientos nos hacen considerar la posibilidad de la presencia de una IgAextrínseca en la superficie de los linfocitos, de tipo lambda, asociada a una SIgG-kappa intrínseca y que daría nombre a la proliferación inmunológica.

Por otra parte, en el tercer paciente (Tabla I) se valoró la posible existencia de una linfoproliferación IgA-lambda asociada a un componente linfoide normal. Mantenemos la posibilidad de este criterio basandonos en los resultados cuantitativos del método inmunoperoxidásico y en los resultados de la inmunofluorescencia directa y de los test de rosetas E, y tambien en la buena evolución clinico-analítica del enfermo cuando se hizo el estudio.

En efecto, por el método del PAP se observó un 12 por 100 de linfocitos positivos para SIgA y un 24 por 100 para s-lambda, siendo significativamente inferiores los porcentajes de positividad a las restantes cadenas. Además, el test de rosetas E fué positivo en el 59 por 100 de las células, por lo que presumiblemente alrededor del 60 por 100 de los linfocitos eran de tipo T, y en un adulto normal el por

taje de células T en la sangre periférica se halla en torno al 70 por 100.

Así mismo, se consideró la posibilidad de que se tratase de una LLC de tipo T, que, aunque extremadamente rara (15, 144), no se puede realmente descartar.

De otra parte, en ninguno de los casos de proliferación monoclonal de la cadena pesada de IgM hemos podido constatar la presencia de cadenas pesadas de IgD asociadas, contrariamente a lo expuesto por FU y cols. (44), quienes demuestran por inmunofluorescencia directa cadenas pesadas de IgM y de IgD sobre los mismos linfocitos, tanto en sujetos normales como en un paciente con una LLC-B. De cualquier manera, estos mismos autores indican que la SIgD puede aparecer aislada o bien asociarse a otra Ig diferente de IgM. No obstante, en ninguno de los siete enfermos analizados tras la fijación con formaldehido-calcio pudimos demostrar claramente la asociación de cadenas pesadas de IgD con otras cadenas pesadas en la superficie de los linfocitos leucémicos. Lo que sí podemos afirmar es que en el material fijado con la solución tamponada de formaldehido-acetona no logramos demostrar IgD, ni en el citoplasma ni en la superficie en ningún linfocito.

Así pues, creemos que el formaldehido-calcio es un fijador mucho más adecuado que el formaldehido-acetona para la demostración de Ig en los linfocitos de la LLC-B, distinguiendo especialmente las SIg, al conservar mejor la antigenicidad de las mismas y aumentar de forma ostensible la sensibilidad del método inmunoperoxidásico.

Aún así, queremos precisar que no todo son ventajas con dicho fijador. En efecto, el formaldehido-acetona ofrece mejores resultados en lo que se refiere a la morfología celular cuando se trata de precisar el estadio de maduración. Además, el formaldehido-calcio permi-

te reconocer claramente el patrón propio de las SIg, pero no proporciona una distinción clara de las GIg, especialmente cuando se hallan en escasa cantidad y/o cuando el citoplasma es escaso, como ocurre frecuentemente en los linfocitos de laLLC. No obstante, la elevada sensibilidad que aporta, asociada a una notable conservación de la morfología celular nos inclina a elegir este fijador en lugar del formaldehido-acetona.

Por lo que respecta a la dupliación parcial del método del PAP, aplicada a material fijado en formaldehido-calcio en los casos tercero y séptimo, creemos que esta variante requiere mayor experimentación en estas enfermedades. De todas formas, los resultados obtenidos nos hacen intuir que estamos ante un sistema de potenciación de la tinción que aumenta notablemente la sensibilidad del método, tanto que incluso llega a demostrar cadenas de Ig que se hallan en mínimas cantidades sobre la superficie linfocitaria. En los dos pacientes estudiados, se detectaron otras cadenas inmunoglobulínicas diferentes a la de la clona demostrada en el método habitual. Nosotros estimamos que tales Ig se encuentran absorbidas sobre la superficie celular, es decir que no son sintetizadas por el propio linfocito que las porta (Ig extrínsecas). Y basamos nuestra opinión en el hecho de que la duplicación parcial implica el uso del Ac secundario cuya especificidad no se dirige contra Ag humanos, como comprobamos con testigos, sino contra los Ag de la especie animal de la que se extrae el Ac primario. Así-mismo, demostramos que no existe unión de los complejos solubles PAP, activa o pasiva, sobre la superficie de los linfocitos; también estas pruebas se realizaron siempre con testigos negativos.

De lo expuesto, sugerimos que la aplicación de esta variante, además de requerir mayor experimentación, sería conveniente ~~realizarla~~ sobre extensiones de linfocitos tratados previamente con enzi-

mas (como la tripsina) y cultivados a corto plazo, con la finalidad de obviar el problema de las Ig extrínsecas.

Finalmente, señalaremos que en cinco de los siete pacientes en que se ensayaron los fijadores comentados, se practicaron estudios complementarios con inmunofluorescencia directa con antisue-
ros polivalentes anti-IgG-IgA-IgM y test de rosetas E con hematíes de carnero para demostración de linfocitos T. (Tabla I).

Con respecto a la inmunofluorescencia, señalaremos que los resultados son concordantes en dos casos (segundo y tercero), y absolutamente discordantes en los tres restantes (primero, sexto y sépti-
mo. En los últimos no pudo ser catalogada su estirpe B, en tanto que por el método inmunoperoxidásico fueron calificados fácilmente como prolifera-
ciones monoclonales de origen B. Tales resultados reflejan la superioridad del método de Sternberger sobre la inmunofluorescencia directa.

De otra parte, en los casos analizados existe una excelente correlación entre el método inmunoperoxidásico y los resultados de los test de rosetas E.

Así pues, el conjunto de los resultados obtenidos avalan el empleo del formaldehído-calcio como fijador adecuado al estudio inmunoperoxidásico de las Ig en extensiones de linfocitos hemoperiféricos de la LLC-B.

LEUCEMIA DE CELULAS LINFOSARCOMATOSAS (LCL)

La primera conclusión que se obtiene del estudio inmunoperoxidásico de las Ig celulares en los dos casos de LCL aporta dos es la efectividad del método y su elevada sensibilidad, corroborada con técnicas de inmunofluorescencia directa y test de rosetas E.

Asímismo, observamos la gran ventaja que aporta este método al permitir distinguir los rasgos morfológicos de las células.

Al igual que en el estudio de las LLC, volvemos a encontrar la ventaja que conlleva la fijación con formaldehido-calcio sobre la solución tamponada de formaldehido-acetona, ventaja que reside en una mejora de la sensibilidad del método del PAP por medio de un aumento en la conservación de la antigenicidad de las Ig. Este hecho es más evidente en el primer caso, en tanto que en el segundo los resultados son hasta cierto punto equiparables, y ello es debido a la propia naturaleza inmunológica de las células linfomasarcomatosas.

Como se sabe, los linfocitos de la LLC proceden de la proliferación del pequeño linfocito que aún no ha adquirido competencia inmunológica. Actualmente, se cree que esta competencia la obtiene el linfocito a nivel del folículo primario, donde tomaría contacto de alguna manera con el Ag. Así pues el linfocito que da origen a la LLC es pobre en Ig porque no ha recibido el estímulo preciso. No obstante, el linfocito de la LCL es inmunologicamente diferente; procede de los elementos linfoides del folículo linfoide secundario, es decir de los centrocitos y centroblastos -según la nomenclatura de Lennert- ó linfocitos pequeños y grandes hendidos y no hendidos -según la nomenclatura de Lukes y Collins-. En consecuencia son células inmunocompetentes, y por tanto en su expresión leucémica se manifiestan como células con una cantidad

de Ig lógicamente superior a la del linfocito inmunológicamente no competente de la LLG.

En los dos casos examinados, si bien ambos son proliferaciones de células linfosarcomatosas, las características tintoriales son distintas. Los linfocitos del primero contienen escasa cantidad de Ig, como se demuestra por la negatividad obtenida tras la fijación con solución tamponada de formaldehído-acetona, y por la positividad aportada por la inmunofluorescencia directa y por el método inmunoperoxidásico desarrollado en material fijado en formaldehído-calcio. En cambio, en el segundo paciente, los linfocitos se tiñen con el método del PAP, por igual con ambos fijadores. Este hecho implica que en este caso la cantidad de Ig de las células linfoides es evidentemente superior.

Estos resultados (Tabla II) concuerdan con las aportaciones más recientes sobre el estudio de los aspectos inmunológicos de los linfomas centrofoliculares ó centrocíticos y/ocentroblásticos. Y no se debe olvidar el hecho de que se considera a la leucemia de células linfosarcomatosas como una diseminación hematológica de dichos linfomas, que en la actualidad se consideran constituidos por linfocitos de origen B.

En la última década, se estimaba que las células de los linfomas centrofoliculares tan sólo contenían SIg, y muy raramente CIg. Y siguiendo esta línea de pensamiento, cuando en un linfoma con esta morfología se detectaba un patrón generalizado de CIg, se definía como "immunocitoma"; es decir como un linfoma con un grado de diferenciación importante hacia el inmunoblasto/imunocito. Esta teoría ha sido rebatida recientemente por Isaacson y cols. (55) y por Stein y cols.(112)

mediante estudios inmunohistoquímicos con el método del PAP. Los autores citados demuestran la presencia de CIg policlonal en linfocitos de folículos linfoides secundarios normales, y de CIg monoclonal en un porcentaje elevado de linfomas centrofoliculares. Así, Isaacson y cols. (55), entre 130 casos de linfomas no Hodgkin y no histiocíticos, demuestran CIg monoclonal en 79, mientras que en el citoplasma de los 51 restantes no detectan ninguna Ig. Por su parte Stein y cols. (112), en cortes histológicos incluidos en parafina y tripsinizados, demuestran CIg monoclonal en 13 de 16 linfomas centrocíticos/centroblásticos, en 2 de 14 centrocíticos y en 22 de 25 centroblásticos.

Conceptualmente, los dos casos aportados son hasta cierto punto diferentes. En efecto, así como en el primero sólo se demuestran SIg, únicamente con formaldehído-calcio, en el segundo se demuestra un intenso patrón de CIgG en el 90-94 por 100 de los linfocitos (Tabla II), que además con el formaldehído-calcio se matiza claramente asociado a SIgG en prácticamente todos los linfocitos con tinción intracitoplásmica; también con dicho fijador se demostró en el segundo caso un 73 por 100 de linfocitos leucémicos débilmente positivos para SIgD.

Es decir, que por el comportamiento de la inmunotinción podríamos afirmar que en el primer caso existe una cierta similitud con los resultados obtenidos en las siete LLC estudiadas anteriormente con los dos fijadores comentados. Quizá la única diferencia importante reside en el hecho de que, en este caso tras la duplicación parcial del método del PAP, se puso de relieve la existencia de dos poblaciones celulares caracterizadas por linfocitos pequeños e intensamente teñidos y formas linfoides grandes de tinción más débil, hecho no observado en dos LLC así estudiadas. Por tanto existe la posibilidad de que esta LCL tuviese su origen en un linfoma centrocítico ó de células hendidas, dado

que entre estos es mayor el porcentaje de casos que no poseen CIg(55, 112).

Por contra, el segundo caso parece estar más en concordancia con los linfomas centroblasticos ó de linfocitos no hendidos. Sin embargo, morfológicamente las formas linfoides leucémicas de este paciente eran más abigarradas que las del primero, con amplias hendiduras o escotaduras que recordaban a monocitos. Este paciente mostraba además un hecho que nos llamó la atención: la inmunotinción indicaba claramente que se trataba de una proliferación monoclonal de cadena pesada IgG y de cadena ligera kappa; y a pesar de ello se observó la presencia de linfocitos morfológicamente idénticos a los leucémicos que se teñían en su citoplasma y en su superficie para la cadena ligera lambda; menos de la mitad de los linfocitos positivos para dicha cadena tenían aspecto de formas normales y bien diferenciadas.

SINDROME DE SEZARY

El único caso estudiado justificó su origen no B, siendo los resultados negativos en las extensiones de linfocitos fijados en formaldehido-acetona, y demostrándose porcentajes de linfocitos positivos inferiores al 1 por 100 con formaldehido-calcio (Ver RESULTADOS); dicha positividad correspondía a un patrón de SIg, y los linfocitos en que se puso de relieve eran pequeños y de aspecto maduro.

LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA (LLA)

Al igual que lo observado en las LLC y LCL, la fijación representa un parámetro a valorar en el momento de enjuiciar los resultados de la inmunotinción. Así, en los tres primeros casos analizados (Tabla III) la solución tamponada de formaldehido-acetona se configura nuevamente como un fijador deficiente en lo que respecta a la sensibilidad del método inmunoperoxidásico del PAP desarrollado en extensiones de concentrados de linfocitos de la sangre periférica. Dicho fijador aporta resultados negativos en términos absolutos, cuya naturaleza es parcialmente desmentida al valorar los resultados obtenidos tras fijar con formaldehido-calcio.

En efecto, el análisis de los resultados correlacionados con las pruebas inmunológicas complementarias permite hacer la siguiente valoración:

a) Primer caso: con formaldehido-acetona no se advirtió positividad en ninguna célula linfoide, en tanto que en los granulocitos presentes aparecía un patrón tintorial politípico para cadenas pesadas (principalmente la de IgG) y para las dos ligeras.

Con formaldehido-calcio se observaron células de hábito linfoideo que se teñían nitidamente para varias cadenas, con un patrón de SIg: morfológicamente eran compatibles con linfocitos normales, y constituían aproximadamente el 1,5 por 100 del total.

Los estudios morfológicos complementarios indicaban la existencia de una población masiva de linfoblastos que, citoquímicamente se caracterizaban por ser positivos a la tinción de las fosfatasas ácidas en grano único centrosómico como es típico de los lin

foblastos T (18). Por otra parte, los test de rosetas E fueron positivos en el 91 por 100 de las células, hecho que confirma el origen T de los linfoblastos.

Así pues, la valoración de estos datos nos indujo a apoyar el diagnóstico de LLA de tipo T, que en la clasificación inmunológica de las LLA de Foon y cols. (43) sería compatible con los subgrupos VIII y IX (los únicos positivos para el test de rosetas E).

Por lo que respecta al método inmunoperoxidásico, sus resultados, compatibles con los obtenidos por la inmunofluorescencia directa, demuestran que los linfoblastos no poseen Ig y que las únicas células positivas son morfológicamente linfocitos bien diferenciados, y se tiñen para diversas cadenas inmunoglobulínicas.

b) Segundo caso: la sangre periférica de este paciente mostraba aproximadamente un 8 por 100 de linfoblastos.

Con formaldehído-acetona los resultados fueron negativos para las cadenas pesadas, en tanto que para las ligeras se observaron algunos linfocitos positivos, en porcentaje inferior al 1 por 1000 (Tabla III), y de aspecto maduro. En los granulocitos y monocitos se distinguía un patrón tintorial politípico, similar al del primer caso.

Con formaldehído-calcio se observó positividad en el 24 por 100 de las células (suma de las cadenas ligeras), destacando un patrón de SIgM en cerca del 10 por 100. Entre las formas blásticas presentes, parecía existir en algunas una positividad débil para SIgM, aunque la subjetividad de tal apreciación nos llevó a considerarlas como negativas.

En cuanto a los estudios inmunológicos complemen

tarios, hemos de destacar un 28 por 100 de células positivas para fluorescencia anti-IgG-IgA-IgM y un 4% de células formadoras de rosetas E.

El método inmunoperoxidásico, igualado en sensibilidad con la inmunofluorescencia directa, la aventaja, sin embargo, en que "distingue" los rasgos morfológicos de las células, matizando las características de los blastos y de los linfocitos normales. Por ello, el hecho de que las células blásticas hayan sido negativas a todas las cadenas inmunoglobulínicas nos orienta a afirmar que este caso es una LLA de tipo no B.

c) Tercer caso: en este paciente, la fijación con formaldehído-acetona sólo permitió demostrar algunos linfocitos de aspecto maduro y en porcentajes inferiores a 1 por 1000 que se teñían ligeramente en el citoplasma para las cadenas ligeras. En cambio con formaldehído-calcio se comprobó la existencia de aproximadamente un 1 por 100 de linfocitos positivos para varias cadenas pesadas y las dos ligeras (Tabla III), morfológicamente bien diferenciados, y con un patrón cromático típico de SIg. Los linfoblastos fueron constantemente negativos, por lo que consideramos que este enfermo tenía una LLA no B.

Citoquímicamente mostraba positividad a la fosfatasa ácida en la generalidad de los blastos, lo que apoya el origen T de la leucemia (18).

En los cuatro casos restantes sólo ensayamos la fijación con formaldehído-acetona. Por tanto si consideramos los resultados obtenidos exclusivamente con este fijador en los siete pacientes, vemos que existe una concordancia con los criterios inmunológicos conocidos en la LLA, es decir que aproximadamente el 95 por 100 de estos enfermos no poseen marcadores de células B. No obstante, el valor que podemos dar a

los datos así obtenidos es relativo, desde el momento que observamos como al cambiar de fijador se modifican aquellos aumentando el porcentaje de células positivas.

Si bien es cierto que en los tres primeros casos el método inmunoperoxidásico se correlaciona bien con los estudios inmunológicos complementarios, los supera desde el punto de vista morfológico, al permitir diferenciar los linfoblastos de los linfocitos normales. Reconocemos que la casuística aportada es insuficiente para extraer conclusiones concretas, sin embargo es orientativa, y sería aconsejable ampliar el estudio paralelo de los fijadores para confirmar los resultados.

Por otra parte, el quinto caso mostraba la particularidad de presentar, tanto en el concentrado de linfocitos hemoperiféricos como en la médula ósea, formas linfoides de mediano tamaño, con uno o dos nucleolos, no plasmocitoides, con intensa positividad intracitoplásmica para diversas cadenas inmunoglobulínicas (Figuras 3, 4, 5 y 6). Eran las únicas células positivas que se encontraron, y su porcentaje no llegaba al 5 por 100 de la celularidad total sumando las positivas para las cadenas pesadas (Tabla III). La tinción era francamente manifiesta al minuto de revelado, y dado la policlonalidad de la misma, estos linfocitos se interpretaron como "reactivos" y no como células leucémicas.

Finalmente, hemos de señalar que la duplicación parcial del método del PAP sólo se aplicó en el primer paciente. Sobre el material fijado en formaldehído-acetona los resultados no mejoraron. En cambio, sobre las extensiones fijadas en formaldehído-calcio aportó una débil positividad para las cadenas ligeras y para la pesada de IgG, hecho posiblemente relacionado con la presencia de Ig de naturaleza extrín

seca, que, a pesar de hallarse en concentraciones mínimas sobre la superficie celular, son puestas de relieve por la sensibilidad del método del PAP. Este hecho se corresponde con otro similar observado y comentado en las LLC, e indica que probablemente los repetidos lavados y la incubación de los linfocitos a 37°C son insuficientes para eliminar totalmente las Ig absorbidas sobre la superficie celular, que, si bien son cuantitativamente reducidas, son demostradas por la duplicación parcial del método.

GAMMAPATIAS MONOCLONALES (GM)

Al evaluar los resultados obtenidos en el estudio inmunoperoxidásico de Ig en ocho casos de GM (seis mielomas múltiple, un mieloma Bence-Jones y una macroglobulinemia de Waldeström) hemos creído conveniente distinguir dos apartados:

1º) Los ensayos técnicos.

2º) El problema conceptual.

Ensayos técnicos:

a) Limpieza de los portaobjetos: en la demostración citoquímica de sustancias celulares el grado de limpieza del cristal del portaobjeto reviste una gran importancia no siempre estimada. Por extensión este hecho afecta ~~afecta~~ a la fase de revelado final de los métodos inmunocitoquímicos, y el defecto reside en la presencia de residuos inorgánicos (principalmente silicatos) que pueden modificar e interferir las reacciones citoquímicas. Por tal motivo comparamos los resultados obteni

dos lavando los portaobjetos en metanol, incubándolos durante 24 horas en una mezcla sulfocrómica (método ampliamente difundido) y frotándolos enérgicamente con lienzo de hilo. Los tres métodos dieron resultados si milares, por lo que aceptamos el último por su sencillez y óptimo resul tado.

b) Fijación: la fijación representa siempre un fac tor condicionante en todo método inmunocitoquímico. A nivel tisular, y concretamente en el caso del método de Sternberger, este tema ha sido am pliamente debatido, siendo experimentadas numerosas combinaciones y va- riantes de fijadores (27, 28). Sin embargo, en extensiones celulares el tema ha sido en general poco estudiado, exceptuando los estudios de Ma- son y cols. (73, 74) en la sangre periférica y en aspirados de médula ó sea y los de Reitamo y cols. (104) en extensiones de concentrados linfo citarios.

En nuestro caso el problema se ha centrado en tor- no a extensiones de aspirados de médula ósea de pacientes afectados de GM. Los aspirados de médula ósea han planteado problemas peculiares y más complejos que los concentrados de linfocitos hemoperiféricos. Tal problemática surge de la diversidad de los elementos celulares presen- tes y del grosor de la extensión, traducidos por la necesidad de conser var de forma óptima la morfología de las diferentes series celulares he matológicas, y, fundamentalmente, de la conservación de la antigenici- dad de las Ig.

De los diferentes fijadores ensayados y comentados, destacamos la acetona al 60 por 100 en frío y la solución tamponada de formaldehído-acetona. Ambos fijadores reúnen cualidades similares en los aspectos descritos, aunque nuestra preferencia se inclina hacia el pri- mero por la simplicidad de su preparación.

No obstante, el formaldehído-acetona tamponado afecta a la antigenicidad de las Ig, como pudimos comprobar en el estudio de las LLC, LCL y LLA, donde a su vez demostramos las elevadas cualidades del formaldehído-calcio. Por tal motivo ensayamos este fijador en los aspirados de médula ósea.

Desgraciadamente, el formaldehído-calcio de Baker proporciona resultados deficientes en cuanto a la conservación de la morfología celular. En efecto, la serie roja madura se pierde en su totalidad, especialmente en la zona central de la extensión, que normalmente es la parte más gruesa de la misma, y donde también se observan pérdidas variables en los citoplasmas de las células nucleadas, con el consiguiente perjuicio de la morfología celular y de la inmunotinción.

Tales razones nos inducen a aceptar el formaldehído-acetona y la acetona al 60 por 100 como los fijadores más cualificados entre los nueve analizados. Sin embargo, tal aceptación está condicionada por los resultados que aportan, que, sin ser los ideales, son suficientes para una valoración objetiva de las GM. A ello contribuye la propia naturaleza de estas enfermedades, en las que las células linfoides suelen poseer un elevado contenido de Ig.

c) Inhibición de la actividad peroxidásica endógena: de los tres métodos puestos en práctica, el de Streeffkerk (118) se ha revelado como el único aceptable. El metanol/peróxido de hidrógeno logra la inhibición completa en un plazo mínimo de veinte minutos, no afectando a la inmunotinción la prolongación de la incubación de las extensiones en dicha solución hasta un plazo de sesenta minutos.

d) Contratinción: como indicamos en repetidas ocasiones a lo largo de esta Tesis, la morfología celular juega un papel importante de cara a la identificación de los distintos elementos citológicos

del aspirado medular y de su nivel de maduración, datos relevantes en la valoración objetiva de la inmunotinción. Pues, tan importante es determinar la estirpe de células que se tiñen para una determinada cadena inmunoglobulínica o para la lisozima, como el reconocimiento de los elementos negativos.

Entre los cinco procedimientos de contratinción evaluados, elegimos la asociación May-Grünwald-Hematoxilina de Harris porque reúne ampliamente las siguientes características:

1a) Pone de relieve la configuración nuclear acentuando los contrastes de las redes cromáticas, sin interferir con la actividad cromática de la DAB en el patrón de tinción de superficie.

2a) En la tinción del citoplasma no debe afectar a las cualidades tintoriales de la DAB, y por otra parte debe caracterizar determinados elementos celulares de interés, como los eosinófilos, cualidades que posee dicha contratinción.

Para lograr esto, es preciso no ampliar el tiempo de exposición al May-Grünwald puro por encima de tres minutos, y esta conclusión es aplicable tanto a las extensiones fijadas en formaldehido-acetona como en acetona al 60 por 100 en frío. Cuando se alarga la exposición, se produce una sumación cromática entre la contratinción y la inmunotinción citoplásmica que origina una coloración verdosa oscura de es caso contraste.

De otra parte, la hematoxilina de Harris, colorante básico que a pH bajo tiñe selectivamente los ácidos nucleicos uniendo a los grupos disociados de la cromatina, logra su efecto tintorial con unos segundos de exposición que se pueden prolongar hasta cuatro o cinco minutos sin defecto de la inmunotinción.

En las extensiones de aspirados medulares en que se demostró lisozima, se aceptó indistintamente la hematoxilina de Harris, sólo o asociada al May-Grünwald.

e) Diluciones de los anticuerpos: tras valorar las pruebas experimentales, aceptamos las siguientes diluciones:

1.- Ac primario: tanto para la determinación de cadenas inmunoglobulínicas como de lisozima, decidimos optar por la dilución 1/100 basandonos en la calidad de los resultados, en la sensibilidad lograda y en la simplificación de la preparación de las soluciones. No obstante, hemos comprobado que, para las Ig, las diluciones de trabajo se pueden aumentar incluso hasta 1/360 sin que por ello se afecte negativamente la inmunotinción, sino al contrario aumentando la especificidad del método.

2.- Ac secundario: aceptamos como adecuada la dilución 1/50 sobre la 1/100, a pesar de obtener resultados idénticos, basandonos en el concepto teórico de emplear una solución de Ac suficientemente concentrada como para reaccionar con todos y cada uno de los Ac primarios fijados a los Ag.

3.- Complejos solubles PAP: elegimos la dilución 1/50 sobre 1/100 por el mismo razonamiento del anterior, si bien a posteriori pensamos que este razonamiento es discutible en este caso y quizá fuera suficiente la dilución 1/100 ó, incluso, una dilución más elevada.

El problema conceptual:

La diversidad de aspectos que encierra este apartado y la complejidad de los mismos, nos obliga a distinguir en él dos subapartados:

1º) Valoración y caracterización de la inmunotinción en las diferentes estirpes hematológicas del aspirado medular.

2º) Correlación de los resultados de la inmunotinción con otros parámetros analíticos de las GM.

Valoración y caracterización de la inmunotinción:

Hemos podido demostrar el marcaje de Ig en elementos de las series roja y granulocítica, y, ocasionalmente, en los monocitos; las series roja y megacariocítica fueron constantemente negativas, si bien las plaquetas frecuentemente se tiñeron para la cadena pesada de IgG, para la predominante en el suero y para ambas ligeras. Hemos de añadir que en todos los casos los granulocitos eosinófilos y basófilos eran negativos para la tinción de Ig.

Es interesante constatar que en los siete mielomas estudiados, una gran mayoría de los elementos linfoides que mostraban un patrón de tinción propio de CIg correspondían a formas linfoplasmocitoides, plasmoblásticas y proplasmocíticas, en tanto que un porcentaje relativamente elevado de células plasmáticas de aspecto maduro permanecían negativas ó debilmente positivas. Creemos que este hallazgo puede estar relacionado con un mayor acúmulo de CIg en las formas plasmáticas inmaduras, en tanto que al llegar a su estadio de mayor diferenciación la secreción de Ig aumenta de tal manera que las cantidades permanentes en el citoplasma son muy escasas, escapando a la visibilidad del microscopio óptico. Este aspecto es una de las cualidades más destacadas del método inmunoperoxidásico, que permite correlacionar la morfología y el estadio funcional de la célula.

Con respecto a la serie granulocítica, hemos de destacar la existencia de positividad granular en el citoplasma de los neutrófilos, maduros e inmaduros, en cantidad variable aunque generalmente escasa. Interpretamos dicha tinción como demostrativa de la presencia de

complejos inmunes Ag-Ac absorbidos pasivamente o fagocitados, y apoyamos esta idea en que en todos los casos examinados la positividad de los granulocitos era generalmente más intensa para la Ig predominante en el suero. Además, en un mieloma IgG se realizó la absorción de la cadena pesada de IgG con el correspondiente antisuero, no tiñéndose ninguna célula del aspirado, lo que apoya definitivamente que la tinción observada en el interior de los granulocitos corresponde a Ig y no a otra estructura bioquímica. Por otra parte, los eosinófilos fueron constantemente negativos a la inmunotinción de cadenas inmunoglobulínicas, hecho que no sabemos si está ligado a una limitación del microscopio óptico, o bien, y ello es más probable, es un hecho real, puesto que se sabe que esta célula no posee receptores para Fc (51) y por tanto sería factible que no mostrase complejos inmunes en su citoplasma.

En cuanto a los monocitos, la generalidad de los mismos mostraron un patrón débil de SIg, casi siempre de SIgG y para las dos cadenas ligeras, sin una correlación clara con la Ig predominante en el suero. Raramente presentaron CIg.

Correlación entre la inmunotinción y otros parámetros analíticos:

En este subapartado comentaremos especialmente los resultados obtenidos en los seis mielomas múltiples estudiados, con especial referencia a la tasa sérica de las cadenas pesadas de IgG, IgA e IgM (Tabla V) a los porcentajes de células mielomatosas positivas para las cadenas pesadas y ligeras de las Ig (Tablas VI y VII).

En estos pacientes hemos comprobado que no existe una correlación estricta entre la cuantificación sérica de Ig y el nú-

TABLA V

RELACION ENTRE LAS TASAS SERICAS DE PARAPROTEINA* Y EL PORCENTAJE DE CELULAS
ELOMATOSAS QUE SE TIÑEN PARA LA MISMA Ig EN CADA CASO.-

CASO	PLASMOCITOS IgG(+) (%)	TASA SERICA DE IgG (mgr.%)	PLASMOCITOS IgA(+) (%)	TASA SERICA DE IgA (mgr%)	PLASMOCITOS IgM(+) (%)	TASA SERICA DE IgM (mgr%)
1º	27	2.280	11	26	35	192
2º	55	3.200	19	45	5	24
3º	40	4.610	12	216	18	40
4º	2	440	75	1.680	0	40
5º	16	906	28	3.600	0	40
6º	4	202	44	3.788	0	5

*Cuantificación por nefelometría.

mero de células mielomatosas positivas. Es decir que no por ser mayor el número de células positivas es más elevada la tasa sérica del Ac correspondiente.

No obstante, si existe una buena correlación en general entre las cadenas (pesadas y ligeras) predominantes en el suero y las que predominan en las células mielomatosas.

De los seis mielomas múltiples estudiados, los tres primeros son de tipo IgG-kappa y los tres restantes IgA-lambda. En aquellos, demostramos porcentajes relativamente importantes de elementos linfoides con positividad para SIgM, siendo en el primer caso un 32 por 100 de los elementos linfoides cuantificados. Estos, se caracterizaban por su escasa diferenciación plasmocitoide que en numerosas ocasiones recordaba a linfocitos grandes. Interpretamos estos resultados como compatibles con la presencia de linfocitos maduros en vías de diferenciación inmunológica, en la que como es sabido se sucede gradualmente la síntesis de IgM, IgD, IgG e IgA, por lo que no es extraño que, junto a las células mielomatosas monoclonales, aparezcan elementos linfoides en plena evolución de síntesis inmunológica.

Así, Taylor y cols. (128) hablan en el mieloma múltiple de una proliferación inmunológicamente monoclonal, pero polimórfica, en la ^{que} van surgiendo tipos celulares diferentes que prosiguen su evolución hasta culminar en la célula plasmática. Pero todos los linfocitos B de una línea evolutiva tendrían en común idénticos idiotipos (regiones hipervariables) pudiendo variar el isotipo (regiones constantes de las cadenas pesadas y ligeras).

Recientemente Nicholls y cols. (88) en un estudio de Ig por inmunofluorescencia en linfocitos hemoperiféricos de 24 enfermos de mieloma, observan una diferencia manifiesta en el isotipo de 19,

siendo los porcentajes de linfocitos SIgM (+) los más importantes (hasta el 42 por 100), aunque en su análisis no llegan a determinar el idiotipo de los Ac.

De forma análoga, en todos los casos que estudiamos, observamos que existen porcentajes variables de linfocitos de aspecto maduro que se tiñen de forma variable para otras Ig distintas a la paraproteína del mieloma. Pero además, comprobamos la existencia de células plasmáticas positivas para otras cadenas también diferentes a las del mieloma, hecho que creemos relacionado ya con un componente reactivo medular, ya con un componente de celularidad normal aún no desplazada por la proliferación neoplásica.

Por otro lado, advertimos que existe en general una excelente correlación entre la paraproteína sérica y la Ig predominante en la citología del mieloma. Y en este sentido, creemos que, en los casos estudiados, las células que presentan un patrón de CIg (con ó sín SIg) deben ser consideradas preferentemente a la hora de definir inmunológicamente a la población proliferante. Basamos esta opinión en el hecho de que en los seis pacientes existe un paralelismo entre la Ig sérica y la CIg predominante en los plasmocitos.

En cualquier caso, y para ser más objetivos, tendríamos que considerar en primer lugar el porcentaje de células CIg positivas, y adicionalmente las SIg positivas. Estas últimas, aisladamente no son valorables, siendo sus porcentajes contradictorios con las tasas séricas de la paraproteína en los pacientes 1º y 3º, dudosos en el 2º, 5º y 6º y acordes tan sólo en el 4º. (Tabla IV).

Otro aspecto problemático de la cuestión es que si sumamos por un lado los porcentajes de células positivas a CIg y por otro

el de las ligeras en cada caso, podemos comprobar que restan porcentajes de células mielomatosas que son negativas a la inmunotinción de Ig, y cu ya cuantía oscila entre el 8 y el 56 por 100 para CIg, y entre 12 y 42 por 100 para SIg. (Tabla VI). Estos datos no son fácilmente explicables. En todo caso creemos que pudiera tratarse o bien de los efectos del for-
maldehido-acetona sobre la antigenicidad de las Ig -hecho difícil de creer por tratarse de un material en principio rico en Ig-, o bien de la existencia efectiva de plasmocitos no sintetizadores de Ig dado que al fin y al cabo se trata de células neoplásicas que sufren diversas alteraciones en su metabolismo. Existe una tercera posibilidad, ya comentada, de que en estas células la síntesis y la secreción fuesen dos fenómenos inmedia
tos, con lo que la cantidad de CIg sería mínima para obtener su expresión al microscopio óptico.

También es llamativo que no siempre hemos demostrado un estricto consenso entre los porcentajes de elementos positivos para CIg y para SIg con respecto a sus cadenas pesadas y ligeras (Tabla VII). Tal diferencia, que es ostensible considerando las cantidades globales en los casos 52 y 62, experimenta ligeras modificaciones al contem
plar separadamente las cadenas intracitoplásmicas (pesadas y ligeras) y las de superficie (idem). En aquellas, las diferencias se circunscriben prácticamente al primer paciente, en tanto en las últimas las discordan
cias aparecen en el 32 y son notables en el 62. El exceso de elementos del mieloma positivos para cadenas ligeras en tales casos, se relaciona probablemente con un exceso de síntesis de dichos polipeptidos, hecho bastante común en el mieloma múltiple (146).

En el único caso de mieloma Bence-Jones estudiado, el patrón inmunoelectroforético confirmó un exceso de secreción de cadenas ligeras lambda. Por su parte, la demostración de Ig por el método

TABLA VI

ALORACION DE LOS PORCENTAJES DE ELEMENTOS LINFOIDES DEL MIELOMA PRESENTES EN EL ASPIRADO MEDULAR, Y DE LOS POSITIVOS Y NEGATIVOS A LA PARAPROTEINA.-

	C.MIELOMATOSAS EN EL ASPIRADO %	C.MIELOMATOSAS (+)A LA CADENA (+)A LA CADENA (-) PARA LAS (-) PARA LAS		C.MIELOMATOSAS (+)A LA CADENA (+)A LA CADENA (-) PARA LAS (-) PARA LAS	
		PESADA DE LA PARAPROTEINA %	LIGERA DE LA PARAPROTEINA %	PESADAS %	CADENAS LIGERAS %
1a	14	27	29	8	42
2a	7	55	50	21	15
3a	35	40	42	30	32
4a	28	75	88	23	12
5a	19	28	66	56	22
6a	23	44	71	52	29
7a	56	-	78	99	22

TABLA VII

VALORACION DE LA TINCION INMUNOPEROXIDASICA DE CADENAS IMMUNOGLOBULINICAS (LIGERAS Y PESADAS) CON RELACION A LOS PATRONES DE SUPERFICIE E INTRACITOPLASMICOS.-

CASO	ELEMENTOS LINFÓIDES DEL MIELOMA POSITIVOS (%)					
	CADENA PESADA	CADENA LIGERA	CADENA PESADA	CADENA LIGERA	CADENA PESADA	CADENA LIGERA
	C - S	C - S	C	C	S	S
1º	27	29	17	22	10	7
2º	55	50	38	29	17	21
3º	40	43	32	27	8	15
4º	75	88	43	52	32	36
5º	28	66	18	40	10	26
6º	44	71	42	48	2	23
7º	-	-	-	-	-	-
8º	13	17	1	3	12	14

immunoperoxidásico mostró una excelente correlación, destacando un 72 por 100 de elementos linfoides positivos para la cadena ligera lambda con un patrón de superficie, sin que en los mismos pudiésemos objetivar claramente la presencia de inmunotinción en el citoplasma.

Finalmente, en la macroglobulinemia de Waldeström estudiada existían numerosas formas linfoides -no linfoplasmatocitoides-, de las que menos de la quinta parte fueron positivas para la cadena pesada de IgM y para kappa. Para otros polipéptidos inmunoglobulínicos los porcentajes fueron muy inferiores (Tabla IV), no observándose, como se esperaba, la presencia generalizada de porcentajes proporcionalmente más elevados correspondientes a formas linfoides normales. Creemos que la abundancia de linfocitos negativos obedece a la escasa cuantía de la IgM que estas células poseen al tener posiblemente su origen en un nivel cercano al del linfocito inmunoincompetente de la LLC. No obstante, en aproximadamente el 50 por 100 de los considerados como negativos aparecía un tinte amarillento débil que frecuentemente era difícil de precisar con objetividad.

En la literatura revisada, no hemos encontrado referencia alguna sobre estudios immunoperoxidásicos de Ig en extensiones de aspirados de médula ósea de pacientes afectados de mieloma. Unicamente Mason y cols. (73) comenta la aplicación de la técnica en esta enfermedad, pero sin profundizar en la misma ni realizar estudios seriados. Todas las referencias recogidas se refieren a estudios en tejidos, destacando entre las mismas los trabajos, ya citados anteriormente, de Taylor (128), Pinkus y col. (97) y Clausen y cols. (22). Quizá tendríamos también que hacer referencia a un reciente trabajo de Johansen y Jensen (58) sobre biopsias de médula ósea y también sobre aspirados y sangre periférica, realizado en 25 enfermos con mieloma múltiple, 13 con gammapatía monoclonal benigna y 20 con plasmocitosis reactiva policlonal; dicho estu-

dio realizado por el método del PAP y empleando el método de fijación de Mason y cols. (73), demuestra la excelente correlación entre el método inmunoperoxidásico y la Ig sérica mielomatosa, extendiendo el comentario hacia los aspectos histológicos de la cuestión, en tanto que los aspectos citológicos no los analiza en profundidad y ni tan siquiera ofrecen los porcentajes de células plasmáticas positivas y negativas de cada caso.

A los resultados aportados por los estudios histológicos tendríamos que señalar algunas objeciones en contra de la valoración que realizan, y concretamente en el caso de los autores indicados.

Así, aunque el estudio del tejido se presta poco a error cuando la cuantía de células positivas es muy escasa, éste aumenta cuando el número de elementos positivos es mayor. Una valoración aproximada a la realidad requiere una formulación matemática compleja que ninguno de los autores citados realizó. Por otra parte, se limitan a mencionar los resultados obtenidos con las cadenas inmunoglobulínicas predominantes, sin ofrecer datos sobre las restantes. Además, la presencia de Ig en el citoplasma celular no es patognomónica de las células linfoides, puesto que también se encuentran en el interior de los granulocitos neutrofilos y los ~~los~~ macrófagos, y este hecho es difícil de diferenciar en el tejido.

PLASMOCITOSIS REACTIVA

Los casos analizados han sido dos. Uno bajo el diagnóstico fundamental de anemia refractaria y el otro una hipoplasia medular asociada a hipergammaglobulinemia de tipo IgG sin que en la inmunoelectroforesis del suero o de la orina existiese refuerzo en los arcos de las cadenas ligeras. En ambos casos destaca el predominio de la cadena pesada de IgG en los plasmocitos, especialmente en el citoplasma. Tal predominio de CIgG en las plasmocitosis ha sido recientemente señalado por

Stein y cols. (112), quienes por el método de Sternberger estudian ganglios linfáticos reactivos y hacen notar la mayor frecuencia de CIgG y la disminución de elementos positivos para IgM.

Por otra parte, la característica benignidad de las plasmocitosis reactivas unida a su policlonalidad inmunológica está justificada en ambos pacientes por la presencia de porcentajes notables de plasmocitos positivos para las cadenas ligeras kappa y lambda, si bien en el primero observamos un cierto predominio de IgG y kappa. (Ver RESULTADOS). Correlacionado con el aumento de la tasa sérica de IgG, existía en el segundo un aumento porcentual de células positivas para IgG, si bien, como hemos indicado, la proporción de elementos positivos para ambas cadenas ligeras estaba equilibrada.

LINFOMAS

Tratandose en los dos casos estudiados de entidades diferentes en sus aspectos morfológico e inmunológico, realizamos la valoración crítica individualmente.

Así, el primer caso es el de un paciente diagnosticado de linfoma de células convolutas (clasificación de Lukes y Collins) y por tanto de origen T. En el aspirado de este enfermo, el estudio inmunoperoxidásico de Ig fué negativo en los blastos presentes, en tanto que hubo resultados muy positivos en el resto de la población linfoide, principalmente en las formas linfoplasmocitoides o de transición entre el linfocito maduro y la célula plasmática (ver RESULTADOS). El hecho de que hallamos visto elementos positivos en todos los estadios madurativos del linfocito, nos confirma en que la negatividad de los blastos no es

consecuencia de la fijación con formaldehído-acetona sino una cualidad intrínseca de los mismos. Así, este caso es demostrativo de una de las principales cualidades del método: la conservación de la morfología de las distintas series hematológicas y su potencial valoración en consonancia con el estadio funcional de la célula.

En lo que respecta al segundo paciente, diagnosticado de linfoma linfocítico difuso bien diferenciado, tuvimos nuevamente ocasión de comprobar la superioridad del formaldehído-calcio sobre la solución tamponada de formaldehído-acetona a pesar de la antigüedad de la suspensión celular en que se verificó el estudio. La valoración del resultado en conjunción con técnicas inmunológicas complementarias fué uniforme en todas ellas, no siendo la suspensión celular obtenida representativa del síndrome linfoproliferativo del enfermo.

DONANTES DE SANGRE SANOS

En los dos casos aportados, los resultados se hallan en consonancia con las estadísticas más recientes (101, 111). El método realizado aventaja a la inmunofluorescencia en que "reconoce" la presencia de los monocitos, células que al ser con frecuencia positivas al marcaje de Ig pueden ser confundidas con linfocitos en dicha técnica.

También en estos casos, el formaldehído-calcio fué mejor que el formaldehído-acetona, aunque los resultados obtenidos contradicen^a los de Mason y cols. (74) que avalan el empleo de este último.

CONCLUSIONES

- 1a.- Hemos realizado una adaptación del método inmunoperoxidásico del PAP (complejos solubles peroxidasa-antiperoxidasa) en extensiones hematológicas. El método desarrollado se ha aplicado a la demostración de inmunoglobulinas y de lisozima a nivel celular.
- 2a.- El método obtenido implica una simplificación técnica y cronológica, a la vez que un aumento de la sensibilidad unido a la conservación de la elevada especificidad de la inmunotinción. De fácil reproducibilidad, es asequible técnicamente a la mayoría de los laboratorios dedicados al estudio de la citología hematológica.
- 3a.- La fijación constituye un importante parámetro a valorar en todo método inmunocitoquímico. Consideramos como más adecuados el formaldehído-calcio en las extensiones de concentrados de linfocitos, e indistintamente la acetona al 60% en frío y el formaldehído-acetona en los aspirados de la médula ósea.
- 4a.- La contratinción es un aspecto a considerar en la evaluación de los resultados. La hematoxilina de Harris es la tinción más adecuada para los concentrados linfocitarios, en tanto que en los as

pirados medulares se obtienen uno resultados morfológicos óptimos con una asociación de May-Grünwald y hematoxilina de Harris.

- 5a.- El estudio inmunoperoxidásico de anticuerpos en extensiones de con centrados linfocitarios de pacientes diagnosticados de leucemia lin foide crónica, demuestra una casi absoluta superioridad del formal- dehido-calcio sobre el formaldehido-acetona tamponado al mejorar la conservación de la antigenicidad de las inmunoglobulinas celulares.
- 6a.- La solución tamponada de formaldehido-acetona supera al formaldehi- do-calcio en la calidad morfológica de los resultados y en la posi-
bilidad de demostrar la existencia de inclusiones cristalinas de in munoglobulinas intracitoplásmicas.
- 7a.- En el estudio de linfocitos de la leucemia linfoide crónica, la de mostración de inmunoglobulinas por el método inmunoperoxidásico en extensiones fijadas en formaldehido-calcio, supera en sensibilidad a la inmunofluorescencia directa.
- 8a.- El método inmunoperoxidásico del PAP, aplicado a las extensiones celulares hematológicas, logra distinguir simultáneamente la pre-
sencia de inmunoglobulinas de superficie e intracitoplásmicas, de finiendo como un método capaz de caracterizar el estadio morfo-
lógico y funcional del linfocito B, y por tanto susceptible de ser
realizado con fines diagnósticos y pronósticos en los síndromes
linfoproliferativos malignos.
- 9a.- La demostración inmunocitoquímica de lisozima puede ser empleada como marcador de exclusión de la estirpe linfoide, a la vez que
facilita la distinción de los monocitos y macrófagos, y permite
catalogar el estadio funcional de maduración de los granulocitos.

- 10a.- En el estudio de pacientes con gammapatías monoclonales malignas, existe en general una buena correlación entre la paraproteína identificada en el suero y la inmunoglobulina predominante en los elementos linfoides neoplásicos.
- 11a.- Tanto en las extensiones de la sangre periférica como en las de los aspirados de médula ósea, observamos una tinción poliespecífica para cadenas pesadas y ligeras en los granulocitos neutrófilos y en los monocitos (no en todos), que interpretamos como consecuencia de la presencia de complejos inmunes antígeno-anticuerpo.

BIBLIOGRAFIA


- 1.- ANAGNOSTOU D., PARKER J.W., TAYLOR C.R., Chir B., Phil D., TINDLE B. H., y LUKES R.J. Lacunar cells of nodular sclerosing Hodgkin's disease. And ultrastructural and immunohistologic study. Cancer 39(3): 1032-1043, 1977.
- 2.- ANDRES T.L., DORMAN S.A., WINN W.G., TRAINER I.D. y PERL D.P. Immunohistochemical demonstration of Toxoplasma Gondii. Am. J. clin. Pathol. 74(4): 500, 1980.
- 3.- ASAMER H., SCHMALZ F., y BRAUNSTEINER H. Immunocytological demonstration of lysozyme (muramidase) in human leukaemic cells. Brit. J. Haematol. 20: 571-574, 1971.
- 4.- AVRAMEAS S. Immunoenzyme techniques: enzymes as markers for the localization of antigens and antibodies. Int. Rev. Cytol. 27: 349-385, 1970.
- 5.- BANKS P.M. Diagnostic applications of an immunoperoxidase method in hematopathology. J. Histochem. Cytochem. 27(8): 1192-1194, 1979.
- 6.- BANKS P.M., KELLER R.H., LI C. and WHITE. Malignant lymphoma of plasmablastic identity. A neoplasm with both "immunoblastic" and plasma cellular features. Am. J. Med. 64: 906-909, 1978.

- 7.- BENDER B.L. y JAFFE R. Effect of fixation on Fc-receptor activity demonstrated by peroxidase. J. Histochem. Cytochem. 27(8): 1055, 1979.
- 8.- BINDER R.A., JENCKS J.A., CHUN B. y RATH C.E. "B" cell origin of malignant cells in a case of american Burkitt's lymphoma. Cancer 36: 161-168, 1975.
- 9.- BOLLUM F.J. Terminal deoxynucleotidyl transferase as a hematopoietic cell marker. Blood 54(6): 1203-1215, 1979.
- 10.- BOYD J.F. Immunohistochemical staining of the Dutcher-Fahey intranuclear body in a case of Waldeström's macroglobulinemia. J. Pathol. 132: 81-91, 1980.
- 11.- BRANDTZAEG P. Studies on J chain and binding site for secretory component in circulating human B cells. I. The surface membrane. Clin. exp. Immunol. 25: 50-58, 1976.
- 12.- BRANDTZAEG P. Studies on J chain and binding site for secretory component in circulating human B cells. II. The cytoplasm. Clin. exp. Immunol. 25: 59-66, 1976.
- 13.- BRETON-GORIUS J., MASON D.Y., BURIOT D., VILDE J. y GRISCELLI C. Lactoferrin deficiency as a consequence of a lack of specific granules in neutrophils from a patient with recurrent infections. Am.J. Pathol. 99: 413-428, 1980.
- 14.- BROUET J.-C. Marqueurs de membrane des cellules de leucémie aigue lymphoblastique. IV^e Congrès de la Société Française d'Hématologie, Strasbourg, France, 1979.
- 15.- BROUET J.-C., FLANDRIN G. y PREUD'HOMME J.-L. Leucémies lymphoïdes chroniques d'origine T. Actualités Hématologiques, 13^e Serie: 160-167. 1979.

- 16.- BROUET J.-C., PREUDHOMME J.-L., PENIT C., VALENSI F., ROUGET P. y SELIGMANN M. Acute lymphoblastic leukemia with Pre-B-cell characteristics. *Blood*, 54(1): 269-273, 1979.
- 17.- BROUET J.-C. y SELIGMANN M. La leucemia linfocítica crónica como trastorno inmunoproliferativo. *Clínica Hematológica Vol. 6/1: Leucemias crónicas*. Salvat Editores, S.A., 1979.
- 18.- CATOVSKY D. T-cell origin of acid-phosphatase-positive lymphoblast. *The Lancet*, 2: 327-328, 1975.
- 19.- CATOVSKY D., PITTMAN S., O'BRIEN M., CHERCHI M., COSTELLO G., FOA R., PEARGE E., HOFFBRAND V., JANOSSY G., GANESHAGURU K. y GREAVES M. Multiparameter studies in lymphoid leukemias. *Am. J. Clin. Pathol.*, 72: 736-745, 1979.
- 20.- CAWLEY J.C., BURNS G.F., WORMAN C.P., ROBERTS B.E. y HAYHOE F.G.J. Clinical and hematologic fluctuations in hairy cell leukemia: a sequential surface-markers analysis. *Blood*, 55(5): 784-791, 1980.
- 21.- CHESS L., LEVINE H., MacDERMOTT P. y SCHLOSSMAN S.F. Immunologic functions of isolated human lymphocyte subpopulations. VI. Further characterization of the surface Ig negative, E rosette negative (null cell) subset. *J. Immunol.*, 115(6): 1483-1486, 1975.
- 22.- CLAUSEN P.P., JACOBSEN M., JOHANSEN P. y THOMENSEN N. Immunohistochemical demonstration of intracellular immunoglobulin in formalin fixed, paraffin enbedded sections, as staining method in diagnostic work. *Acta path. microbiol. scand. Sect. C*, 87: 307-312, 1979.
- 23.- COLLINS R.D., WALDRON J.A. y GLICK A.D. Results of multiparameter studies of T-cell lymphoid neoplasms. *Am. J. Clin. Pathol.*, 72: 699-707, 1979.
- 24.- COONS A.H. Histochemistry with labeled antibody. *Inter. Rev. Cytol.*, 5:

1-23, 1956.

- 25.- COONS A.H. The beginnings of immunofluorescence. J Immunol., 97: 499-503, 1961.
- 26.- CURRAN R.C. y GREGORY J. Demonstration of immunoglobulin in cryostat and paraffin sections of human tonsil by immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. J. Clin. Pathol., 31: 974-983, 1978.
- 27.- CURRAN R.C. y GREGORY J. Effects of fixation and processing of immunohistochemical demonstration of immunoglobulin in paraffin sections of tonsil and bone marrow. J. Clin. Pathol., 33: 1047-1057, 1980.
- 28.- CURRAN R.C. y JONES E.I. Immunoglobulin-containing cells in human tonsils as demonstrated by immunohistochemistry. Clin. exp. Immunol., 28: 103-115, 1977.
- 29.- DeLELLIS R.A., STENBERGER L.A., MANN R.B., BANKS P.M. y NAKANE P.K. Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology. Am. J. Clin. Pathol. 71: 483-488, 1979.
- 30.- DIGHIERO G. Les marqueurs de membrane del lymphocytes dans la leucémie lymphoid chronique. IV^e Congrès de la Société Française d'Hématologie, Strasbourg, France, 1979.
- 31.- DIGHIERO G. Recognition of B lymphocytes by immunoperoxidase on the Technicon Hemalog D System. Technicon Symposium on Automated Flow Cytichemistry. Phoenix, Arizona, USA, 1979.
- 32.- DIGHIERO G., BODEGA E., MAYZNER R. y BINET J.L. Two new applications of the immunoperoxidase method: cell by cell quantitation of surface membrane immunoglobulins and automated recognition of B-lymphocytes by the Hemalog D System. 22nd ASH Meeting, Phoenix, Arizona, USA, 1979.
- 33.- DIGHIERO G., BODEGA E., MAYNER R., y BINET J.L. Individual cell-by-cell quantitation of lymphocyte surface membrane Ig in normal and CLL

- lymphocytes and during ontogeny of mouse B lymphocytes by immunoperoxidase assay. *Blood*, 55(1): 93-100, 1980.
- 34.- DIGHIERO G., MAYZNER R., MERLE-BERAL H. y BINET J.L. Une nouvelle approche a la separation automatique du lymphocyte B et T. Application de la methode de l'immunoperoxydase a l'Hemalog. IVE Congrès de la Société Française d'Hématologie, Strasbourg, France, 1979.
- 35.- DIGHIERO G., MAYNER R., ROISIN J.P. y BINET J.L. Automation du comptage des lymphocytes B par l'Hemalog D. 9th Technicon International Symposium, Paris, France, 1979.
- 36.- DIGHIERO G., MAYZNER R., ROISIN J.P. y BINET J.L. Automated recognition of B lymphocytes by immunoperoxidase on the Hemalog D System and its applications. 4th International Congress of Immunology, Paris, France, 1980.
- 37.- DOUGLAS S.D. y ACKERMAN S.K. Anatomía del sistema inmunitario. Clínica Hematológica 5/1: Trastornos de la linfopoyesis y función linfoide. Salvat Editores, S.A., 1978.
- 38.- ESPINOS D., DIAZ J., VILLEGAS A. y DEL RIO M. Clasificación funcional de los linfomas malignos. *Sngra*, 22(5-B): 677-696, 1977.
- 39.- ERLANDSEN S.L., PARSONS J.A., BURKE J.P., REDICK J.A., VAN ORDEN D.E. y VAN ORDEN L.S. A modification of the unlabeled antibody enzyme method using heterologous antisera for the light microscopic and ultrastructural localization of insulin, glucagon and growth hormone. *J. Histochem. Cytochem.*, 23(9): 666-677, 1975.
- 40.- ERLANDSEN S.L., PARSONS J.A. y  DNING C.B. Technical parameters of immunostaining of osmicated tissue in epoxi sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 27(9): 1286-1289, 1979.
- 41.- FEREMANS W.W., BIEVA G.J. y CAUDRON M. Leucémie aigue promonocytaire

avec complexes ribosomes lamellaires et lysozymurie. IV^e Congrès de la Société Française d'Hématologie, Strasbourg, France, 1979.

- 42.- FOLLEZOU J.Y., DIGHIERO G., ROISIN J.P. y BINET J.L. Ontogeny of B lymphocytes in mice. Quantification of surface membrane immunoglobulins by immunoperoxidase assay. Immunology, 34: 733-739, 1978.
- 43.- FOON K.A., BILLING R.J., TERASAKI P.I. y CLINE M.J. Immunologic classification of acute lymphoblastic leukemia implications for normal lymphoid differentiation. Blood, 56(6): 1120-1126, 1980.
- 44.- FU S.M., WINCHESTER R.J. y KUNKEL H.G. Similar idiotypic specificity on the membrane IgD and IgM of human B lymphocytes. J. Immunol., 114: 250-252, 1975.
- 45.- GOASGUEN J., LEBLAY R. y GUERIN D. Etude quantitative des immunoglobulines de membrane des plasmocytes circulants dans deux cas de maladie de Kahler. IV^e Congrès de la Société Française d'Hématologie, Strasbourg, France, 1979.
- 46.- GRAHAN R.C. y KARNOVSKY M.J. The early stages of absorption on injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem., 14(4): 291-302, 1966, 1966.
- 47.- HAGHIGHI P., TABEI Z., KHARAZMI A., GERAMI S., ABADI P. y HAGHSHEENASS M. Immunoperoxidase study in alfa-chain disease. Arch. Pathol. Lab. Med., 102: 555-557, 1978.
- 48.- HALL J.G., BIRBECK M.S.C., ROBERTSON D., PEPPARD J. y ORLANS E. The use of detergents and immunoperoxidase reagents for the ultrastructural demonstration of internal immunoglobulins in lymph cell. J. Immunol. Met., 19: 351-359, 1978.
- 49.- HATTORI T., UCHIYAMA T., TAKATSUKI K. y UCHINO H. Fc-gamma and Fc-mu

- receptors in B cell neoplasms. *Acta haematol.*, 63: 247-251, 1980.
- 50.- HAYHOE J., BURNS G., CAWLEY J., y STEWART J.W. Cytochemical, ultrastructure and immunological studies of circulating Reed-Sternberg cells. *Brit. J. Haemat.*, 38: 485, 1978.
- 51.- HUHN D., ANDREEWA P., RODT H., THIEL E. y EULITZ M. Demonstration of the Fc-receptor of blood cells by soluble peroxidase-antiperoxidase (PAP) complexes. *Blut*, 36: 263-273, 1978.
- 52.- INFANTE F. La inmunología y sus promesas. *Jano*: 30-49, 1979.
- 53.- ISAACSON P. Immunochemical demonstration of J chain: a marker of B-cell malignancy. *J. Clin. Pathol.*, 32: 802-807, 1979.
- 54.- ISAACSON P. y WRIGHT D.H. Anomalous staining patterns in immunohistologic studies of malignant lymphoma. *J. Histochem. Cytochem.*, 27(8): 1197-1199, 1979.
- 55.- ISAACSON P., WRIGTH D.H., JUDD M.A., JONES D.B. y PAYNE S.V. The nature of the immunoglobulin-containing cells in malignant lymphoma: An immunoperoxidase study. *J. Histochem. Cytochem.*, 28(8): 761-760, 1980.
- 56.- ITO G., MIURA S. y SUZUKI I. Immunohistochemical detection of Fc receptor by using soluble immune complexes of peroxidase-antiperoxidase immunoglobulin G. *J. Histochem. Cytochem.*, 25(4): 252-258, 1976.
- 57.- JÄGER G. A simple test for the terminal deoxynucleotidyl transferase using the peroxidase-antiperoxidase technique. *Blut*, 42: 259-261, 1981.
- 58.- JOHANSEN P. y JENSEN M.K. Enzyme cytochemistry and immunohistochemistry in monoclonal gammopathy and reactive plasmacytosis. *Acta path. microbiol. scand. Sect. A*, 88: 377-382, 1980.

- 59.- KASCHULA R.O.C., STAPLES W.G. y VISSER A.E. Immunohistochemical characterization of Burkitt's lymphoma. S. Afr. med. J., 53: 655-658, 1978.
- 60.- KONRADS A., LAASER U., HUMMERICH W., MÖDDER B., ZACH J., KRUEGER G. R.F. y SCHAEFER H.E. Sézary Syndrome: immunocytological and cytochemical variability of Sézary cells. Acta haematol., 63: 55-57, 1980.
- 61.- KUNG P.C., LONG J.C., McCAFFREY R.P., RATLIFF R.L., HARRISON T.A. y BALTIMORE D. Desoxynucleotidin-transferasa terminal en el diagnóstico de la leucemia y del linfoma maligno. Am. J. Med. (Esp.), 7(5): 355-361, 1978.
- 62.- LAURENT G., GOURDIN M.F., FLANDRIN G., KUHLEIN E., PRIS J. y REYES F. Leucémie aigue lymphoblastique compliquant une leucémie lymphoide chronique. Etude immuno-cytochimique. IVE Congrès de la Société Française d'Hématologie, Strasbourg, France. 1979.
- 63.- LAURENT G., GOURDIN M.-F. y REYES F. Immunoperoxidase detection of immunoglobulins in cell of immunoproliferative diseases. A comparison between conjugate and nonconjugated (PAP) procedures. Am. J. Pathol., 74: 265-274, 1980.
- 64.- LE PORRIER M., DIGHIERO G., AURZEMERY M. y BINET J.L. Detection et quantification des anticorps plaquettaires par l'immunoperoxidase. IVE Congrès de la Société Française d'Hématologie, Strasbourg, France, 1979.
- 65.- LEES O. Immunoperoxidase methods of B lymphocytes recognition. Europ. J. Cancer, 13: 345-349, 1977.
- 66.- LOBO P.I., WESTERVELT F.B. y HORWITZ D.A. Identification of two populations of immunoglobulin-bearing lymphocytes in man. J. Immunol. 114(1): 116-119, 1975.

- 67.- LUBIT B.W., SCHRECK R.R., MILLER O.J. y ERLANGER B.F. Human chromosome structure as revealed by an immunoperoxidase staining procedure. *Exptl. Cell. Res.*, 89: 426-428, 1974.
- 68.- LUKES R.J. y COLLINS R.D. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer*, 34: 1488-1503, 1974.
- 69.- LUKES R.J. y COLLINS R.D. Lukes-Collins classification and its significance. *Cancer Treat. Rep.*, 61: 971-979, 1977.
- 70.- MARUCCI A.A. y DOUGHERTY R.M. Use of the unlabeled antibody immunohistochemical technique for the detection of human antibody. *J. Histochem. Cytochem.*, 23(8): 618-623, 1975.
- 71.- MASON D.Y. Intracellular lysozyme and lactoferrin in myeloproliferative disorders. *J. Clin. Pathol.*, 30: 541-546, 1977.
- 72.- MASON D.Y. y BIBERFELD P. Technical aspects of lymphoma immunohistology. *J. Histochem. Cytochem.*, 28(8): 731-745, 1980.
- 73.- MASON D.Y., FARRELL C. y TAYLOR G.R. The detection of intracellular antigen in human leucocytes by immunoperoxidase staining. *Br. J. Haematol.*, 31: 361-370, 1975.
- 74.- MASON D.Y., LABAUME S. y PREUD'HOMME J.-L. The detection of membrane and cytoplasmic immunoglobulins in human leucocytes by immunoperoxidase staining. *Clin. exp. Immunol.*, 29: 413-421, 1977.
- 75.- MASON D.Y., LEONARD R.C.F., LAURENT G. y GOURDIN M. Immunoperoxidase staining of surface and intracellular immunoglobulin in human neoplastic lymphoid cells. *J. Clin. Pathol.*, 33: 609-616, 1980.
- 76.- MASON D.Y. y SAMMONS R. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of intracellular constituents. *J. Clin. Pathol.*, 31: 454-460, 1978.

- 77.- MASON D.Y. y TAYLOR C.R. The distribution of muramidase (lysozyme) in human tissues. J. Clin. Pathol., 28: 124-132, 1975.
- 78.- MASON D.Y. y TAYLOR C.R. Technical methods: staining of the A antigen on human erythrocytes. J. Clin. Pathol., 28: 594-595, 1975.
- 79.- MASON T.E., PHIFER R.F., SPICER S.S., SHALLOW R.A. y DRESKIN R.B. An immunoglobulin-enzyme method for lokalizing tissue antigens. J. Histochem. Cytochem., 17: 563-569, 1969.
- 80.- MENDELSON G., EGGLESTON J.C. y MANN R.B. Relationship of lysozyme (muramidase) to histiocytic differentiation in malignant histiocytosis. An immunohistochemical study. Cancer, 45: 273-279, 1980.
- 81.- MESA-TEJADA R., PASCAL R. y FENOGLIO C.M. Immunoperoxidase: a sensitive immunohistochemical technique as a "special stain" in the diagnostic pathology laboratory. Human Pathol., 8(3): 313-320, 1977.
- 82.- MESTECKY J., PREUD'HOMME J.-L., CRAGO S.S., MIHAESCO E., PRCHAL J.T. y OKOS A.J. Presence of J chain in human lymphoid cell. Clin. exp. Immunol., 39: 371-385, 1980.
- 83.- MILLER J.F.A.P. Fundamento celular de la capacidad de respuesta inmune. Clínica Hematológica 5/1: Trastornos de la linfopoyesis y función linfoide. Salvat Editores, S.A. 1978.
- 84.- MOLLER G. Immunoglobulins: structure, synthesis, membrane representation and function. Immunol. Rev., 37. 1977.
- 85.- MONTERO C. Los métodos inmunohistoquímicos y su potencial de aplicación en Anatomía Patológica. Morfología normal y patológica. Sec. B, Vol. 2: 851-862, 1978.

- 86.- NAKANE P.K. y PIERCE G.B. Enzyme labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. J. Histochem. Cytochem. 14(2): 929-931, 1966.
- 87.- NAKANE P.K. y PIERCE G.B. Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. J. Cell. Biol., 33: 307-318, 1967.
- 88.- NICHOLLS M., VINCENT P.C., REPKA E., SAUNDERS J. y GUNZ F.W. Isotypic discordance of paraproteins and lymphocyte surface immunoglobulins in myeloma. Blood 56(4): 1981.
- 89.- NOTANI G.W., PARSONS J.A. y ERLANDSEN S.L. Versatility of Staphylococcus Aureus protein A in immunocytochemistry. J. Histochem Cytochem., 27(11): 1979.
- 90.- PANGALIS G.A., NATHWANI B.M. y RAPPAPORT H. Detection of cytoplasmic immunoglobulin in well-differentiated lymphoproliferative disease by the immunoperoxidase method. Cancer, 45: 1334-1339, 1980.
- 91.- PARKER J.W. Immunologic basis of the redefinition of malignant lymphomas. Am. J. Clin. Pathol., 72: 670-686, 1979.
- 92.- PASINO M., ROSANDA-VADALA C., ASTALDI A., TONINI G., ASTALDI G.C.B., PERUTELLI P., COMELLI A., BERNARDI B., GIOVANELLI A., MORI P.G., y MASSIMO L. Lymphoid cell surface markers in acute lymphocytic leukemia. Scand. J. Haematol., 20: 147-152, 1978.
- 93.- PETRUTZ P., SAR M., ORDRONNEAU P. y DIMEO P. Specificity in immunocytochemical staining. J. Histochem. Cytochem., 24(10): 1110-1115, 1976.
- 94.- PETRUTZ P., SAR M., ORDRONNEAU P. y DIMEO P. Reply to the letter of Swaab et al.: "can specificity ever be prove in immunocytochemical staining?". J. Histochem. Cytochem., 25(5): 390-391, 1977.

- 95.- PILLOT J. y PELTIER A.P. Técnicas en Immunología. 1ª Ed. española. Editorial JIMS (Barcelona), 1976.
- 96.- PINKUS G.S. y SAID J.W. Profile of intracytoplasmic lysozyme in normal tissues, myeloproliferative disorders, hairy cell leukemia, and other pathologic processes. Am. J. Pathol., 89: 351-366, 1977.
- 97.- PINKUS G.S. y SAID J.W. Specific identification of intracellular immunoglobulin in paraffin section of multiple myeloma and macroglobulinemia using an immunoperoxidase technique. Am. J. Pathol., 87: 47-58, 1977.
- 98.- PIQUET Y., VENZON G., MOULINIER J. y ANGEVAIN P. Une methode immunoenzymologique de depistage et de titrage des Ac anti-plaquettes. IV^e Congrès de la Société Française d'Hématologie, Strasbourg, France, 1979.
- 99.- POPPEMA S. The diversity of the immunohistological staining pattern of Sternberg-Reed cells. J. Histochem. Cytochem., 28(8): 788-791, 1980.
- 100.- PREUD'HOMME J.-L. y SELIGMANN M. Surface bound immunoglobulins as a cell marker in human lymphoproliferative diseases. Blood, 40(6): 777-794, 1972.
- 101.- PREUD'HOMME J.-L. y SELIGMANN M. Intérêt en Hématologie de la recherche des immunoglobulines liées a la membrane des lymphocytes. Actualités Hématologiques, 7^e Serie: 239-252, 1973.
- 102.- RAFF M.C., MEGSON M., OWEN J.J.T. y COOPER M.D. Early production of intracellular IgM by B-lymphocyte precursors in mouse. Nature, 259: 224-226, 1976.
- 103.- REITAMO S., KONTTINEN Y.T., RANKI A. y HÄYRY P. The relation of di

fferent inflammatory cell types to the various parenchymal components of rejecting kidney allografts. *Histopathol.*, 4: 517-532, 1980.

- 104.- REITAMO S., RANKI A., KONTTINEN Y.T. y HÄYRY P. Immunoperoxidase identification of intracellular immunoglobulins from cell smear. *Am. J. Pathol.*, 73(2): 248-249, 1980.
- 105.- RICHARDS F.F., KONIGSBERG W.H., ROSENSTEIN R.W. y VARGA J.M. On the specificity of antibodies. *Science*, 187: 130-137, 1975.
- 106.- ROITT I. *Inmunología esencial*. 2ª Ed. española. Editorial JIMS (Barcelona), 1975.
- 107.- SAN MIGUEL J., VICENTE V., VIDAL V. y HERNANDEZ F. Avances en la biología molecular de las inmunoglobulinas. *Tratado de medicina practica MEDICINE*, 14: 825-834, 1978.
- 108.- SASAKI R., TAKAKU F., SAKAMOTO S. y KANO H. Y. Terminal deoxynucleotidyl transferase activity and B cell markers in chronic myelogenous leukemia blast crisis. *Acta haemat.*, 62: 143-147, 1979.
- 109.- SCHMIDT G.M., BROSS K.J., BLUME K.G., ENDERS N., SANTOS S., NOVITSKI M. y CHILLAR R.K. Detection of platelet-directed immunoglobulin G in sera using the peroxidase-anti-peroxidase (PAP) slide technique. *Blood*, 55(2): 299-303, 1980.
- 110.- SELZER G., SHERMAN G., CALLIHAN T.R. y SCHWARTZ Y. Primary small intestinal lymphomas and alpha-heavy-chain disease. *Israel J. Med. Sc.*, 15(2): 111-123, 1979.
- 111.- SIEGAL F.P. y GOOD R.A. Marcadores de diferenciación de los linfocitos humanos y su aplicación a la inmunodeficiencia y enfermedades linfoproliferativas. *Clínica Hematológica* 5/1: Trastornos de la linfopoyesis y función linfoide. Salvat Editores, S.A., 1978.

- 112.- STEIN H., BONK A., TOLKSDORFF G., LENNERT K., RODT H. y GERDER J.
Immunohistologic analysis of the organization of normal lymphoid tissue and Non-Hodgkin's lymphomas. J. Histochem. Cytochem., 28(8): 746-760, 1980.
- 113.- STEINMANN G., MERTELSMANN R., SILVERSTONE A.E. y ETIENNE B. Ultrastructural localization of terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) in human cells. 69 Annual Meeting of the American Society of clinical oncology, 1980.
- 114.- STERNBERGER L.A. Immunocytochemistry. Second edition. A Wiley Medical Publication, New York, USA, 1979.
- 115.- STERNBERGER L.A. The unlabeled antibody (PAP) method. Introduction. J. Histochem. Cytochem., 27(12): 1657, 1979.
- 116.- STERNBERGER L.A., HARDY P.H., CUCULIS J.J. y MEYER H.G. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. J. Histochem. Cytochem., 18(5): 315-333, 1970.
- 117.- STIEHM E.R. Trastornos inmunológicos en el niño. Editorial Pediátrica (Barcelona, España), 1975.
- 118.- STREEFKERK J.G. Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. J. Histochem. Cytochem., 20: 829-831, 1972.
- 119.- SU-MING HSU y REE H.J. Self-sandwich method. An improved immunoperoxidase technic for the detection of small amounts of antigens. Am. J. Clin. Pathol. 74: 32-40, 1980.
- 120.- SWAAB D.F., POOL C.W. y VAN LEEUWEN F.W. Can specificity ever be proved in immunocytochemical staining? (letter). J. Histochem. Cytochem., 25(5): 388-391, 1977.

- 121.- TAYLOR C.R. The nature of Reed-Sternberg cells and other malignant "reticulum" cells. Lancet, 2: 802-806, 1974.
- 122.- TAYLOR C.R. An immunohistological study of follicular lymphoma, reticulum cell sarcoma and Hodgkin's disease. Europ. J. Cancer, 12: 61-75, 1976.
- 123.- TAYLOR C.R. Immunocytochemical methods in the study of lymphoma and related conditions. J. Histochem. Cytochem., 26(7): 496-512, 1978.
- 124.- TAYLOR C.R. Immunologic studies of lymphomas. J. Histochem. Cytochem., 27(8): 1189-1191, 1979.
- 125.- TAYLOR C.R. Results of multiparameter studies of B-cell lymphomas. Am. J. Clin. Pathol., 72: 687-698, 1979.
- 126.- TAYLOR C.R. A practical approach to immunohistologic studies of lymphoreticular neoplasia. J. Histochem. Cytochem., 27(8): 1188, 1979.
- 127.- TAYLOR C.R. Immunohistologic studies of lymphomas. Past, present and future. J. Histochem. Cytochem., 28(8): 777-787, 1980.
- 128.- TAYLOR C.R., Chir B., Phil D., RUSSELL R. y CHANDOR S. An immunohistologic study of multiple myeloma and related conditions, using an immunoperoxidase method. Am. J. Clin. Pathol., 70: 612-622, 1978.
- 129.- TERNYNCK T., DIGHIERO G., FOLLEZOU J. y BINET J.L. Comparison of normal and CLL lymphocytes surface Ig determinants using peroxidase-labeled antibodies. I: Detection and quantitation of light chain determinants. Blood, 43(3): 789-795, 1974.
- 130.- TOUGARD C., TIXIER-VIDAL A. y AVRAMEAS S. Comparison between peroxidase-conjugated antigen or antibody and peroxidase-antiperoxidase complex in a postembedding procedure. J. Histochem. Cytochem., 27(12): 1630-1633, 1979.
- 131.- UHR J.W. La membrana del linfocito. Tiempos médicos, 137: 47-54,

1979.

- 132.- VACCA L.L., ROSARIO S.L., ZIMMERMANN E.A., TOMASHEFSKY P., PO-YING N.G. y HSU K.C. Application of immunoperoxidase techniques to localize horseradish peroxidase-tracer in the central nervous system. J. Histochem. Cytochem., 23(3): 208-215, 1975.
- 133.- VAN DEN TWEEL J.G., LUKES R.J., TAYLOR C.R., Chir B. y Phil D. Pathophysiology of lymphocyte transformation. A study so-called composite lymphomas. Am. J. Clin. Pathol., 71: 509-520, 1979.
- 134.- VANDESANDE P. A critical review of immunocytochemical methods for light microscopy. J. Neuroscience Met., 1: 3-23, 1979.
- 135.- VITETTA E. y UHR J.W. Immunoglobulin-receptors revisited. A model for the differentiation of bone-marrow-derived lymphocytes is described. Science, 189: 964-969, 1975.
- 136.- VITETTA E.S., FORMAN J. y KETTMAN J.R. Cell surface immunoglobulin. XVIII. Functional differences of B lymphocytes bearing different surface immunoglobulin isotypes. J. exp. Med., 143: 1055-1066, 1976.
- 137.- VIVES-PUIGGROS J. Células de la inmunidad. Jano, 22-26, 1977.
- 138.- WARNKE R. Alteration of immunoglobulin-bearing lymphoma cells by fixation. J. Histochem. Cytochem., 27(8): 1195-1196, 1979.
- 139.- WARNKE R. y LEVY R. Detection of T and B cell antigens with monoclonal antibodies. J. Histochem. Cytochem., 28(8): 771-776, 1980.
- 140.- WILLINGHAN M.C. y YAMADA S.S. Development of a new primary fixative for electron microscopic immunocytochemical localization of intracellular antigens in cultured cells. J. Histochem. Cytochem., 27(5): 947-960, 1979.

- 141.- WINCHESTER R.J., FU S.M., HOFFMAN T. y KUNKEL L.H.G. IgG on lymphocyte surfaces: technical problems and the significance of a third cell population. J. Immunol., 114(4): 1210-1212, 1975.
- 142.- WOESSNER S. y LAFUENTE R. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. Editorial TORAY, S.A. (Barcelona), 1979.
- 143.- WOESSNER S., LAFUENTE R., CAPDEVILA J. y SANS-SABRAFEN J. Leucemia linfo sarcomatosa crónica: consideraciones citológicas y citoquímicas. Sngra., 22(5-B): 912-921, 1977.
- 144.- WOESSNER S., SANS-SABRAFEN J. y LAFUENTE R. Leucemia linfática crónica. Presentación de dos casos. Med. clín. (Barcelona), 72: 85-88, 1979.
- 145.- ZEHR D.R. Use of hydrogen peroxide-egg albumin to eliminate nonspecific staining in immunoperoxidase techniques. J. Histochem. Cytochem., 26(5): 415-416, 1978.
- 146.- ZOLLA S., BUXBAUM J., FRANKLIN E.C. y SCHARFF M.D. Synthesis and assembly of immunoglobulins by malignant plasmacytes. I. Myelomas producing gamma chains and light chains. J. Exp. Med. 132: 148-162, 1970.
-